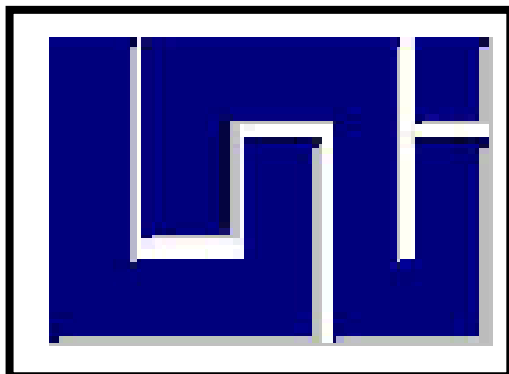


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

Mon  
667.26  
M337  
2012



**EXTRACCION DE COLORANTE A PARTIR DE LA FLOR DE  
JAMAICA**

TRABAJO DE DIPLOMA PRESENTADO POR:

**Silvia Elena Marín Castillo.**

**Claudia María Mejía Castillo.**

PARA OPTAR AL TITULO DE:

**INGENIERO QUÍMICO**

TUTOR

**Msc. Ing. Silvio Rojas Zambrana.**

Managua, Nicaragua.  
Septiembre de 2012

# INDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
AGRADECIMIENTO.....	i
DEDICATORIA.....	ii
RESUMEN.....	iii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
III. JUSTIFICACION .....	3
IV. OBJETIVOS.....	4
4.1 Objetivo General .....	4
4.2 Objetivos específicos .....	4
V. MARCO TEORICO .....	5
5.1 Flor de Jamaica.....	5
5.1.1 Propiedades químicas .....	5
5.1.2 Aplicaciones .....	6
5.2 Antocianinas.....	7
5.2.1 Estructura .....	7
5.2.2 Estabilidad en los alimentos .....	8
5.2.3 Efecto del Ph .....	8
5.2.3.1 Grados Dornic. ....	9
5.2.4 Efecto de la temperatura .....	9
5.2.5 Efecto del oxígeno y el ácido ascórbico .....	10
5.2.6 Derivados de antocianidina.....	10
5.3 Colorantes.....	10
5.3.1Clasificación de los Colorantes .....	11
5.3.2 Colorantes Naturales.....	12
5.3.3 Colorantes artificiales .....	12
5.3.4 Colorantes alimenticios.....	13
5.4 Humedad en los alimentos.....	13
5.4.1 Métodos de secado. ....	14
5.5 Métodos de extracción Sólido- Líquido .....	14

5.5.1	Lixiviación.....	14
5.5.1.1	Lixiviación discontinua.....	15
5.5.1.2	Lixiviación Continua.....	15
5.5.1.3	Preparación del sólido .....	15
5.5.1.4	Temperatura de Lixiviación.....	16
5.5.1.5	Equipos utilizados para la Lixiviación.....	16
5.5.1.5.1	Extractores de Lecho Estático o Fijo.....	16
5.5.1.5.2	Extractores De Lecho Móvil. ....	16
5.5.2	Extracción con Equipo Soxhlet .....	17
5.5.2.1	Ventajas del uso del Extractor Soxhlet .....	18
5.5.2.2	Desventajas del uso del Extractor Soxhlet.....	19
5.6	Estabilizador de pH. ....	19
5.6.1	Ácido cítrico .....	19
5.6.1.1	Características generales .....	19
5.7	Etanol. ....	20
5.8	Capacidad de tintura .....	21
VI.	HIPOTESIS.....	22
VII.	MATERIAL Y MÉTODO .....	23
7.1	Materia Prima.....	23
7.2	Equipos, materiales y reactivos.....	23
7.2.1	Equipos .....	23
7.2.1.1	Balanza electrónica (portátil). ....	23
7.2.1.2	Horno secador.....	23
7.2.1.3	Horno secador/ mufla: .....	23
7.2.1.4	Procesador de alimentos .....	23
7.2.1.5	Extractor Soxhlet .....	24
7.2.1.6	Rotavapor .....	24
7.2.1.7	pH metro .....	24
7.2.2	Materiales.....	24
7.2.3	Reactivos.....	24
7.3	Metodología .....	25
7.3.1	Preparación de la muestra.....	25
7.3.2	Extracción.....	25

7.3.3	Concentración del extracto .....	26
7.3.4	Evaluación del poder tintóreo y estabilidad en el tiempo.....	26
7.3.5	Análisis estadístico .....	26
7.4	Diagramas de Flujos Del Proceso .....	27
7.4.1	Extracción con Etanol al 96 % y 0.03% P/V de Ácido Cítrico. ....	27
7.4.2	Extracción con Etanol al 96 % .....	28
VIII.	DISCUSION DE RESULTADOS .....	29
8.1	Evaluación de las condiciones de Humedad.....	29
8.1.1	Análisis Estadístico.....	30
8.2	Condiciones Óptimas de Extracción con el equipo Soxhlet. ....	33
8.3	Resultados del proceso de Extracción. ....	36
8.3.1	Estimación de parámetros. ....	36
8.3.2	Selección de las pruebas estadísticas. ....	36
8.3.2.1.1	Prueba de Normalidad Anderson-Darling .....	37
8.3.3	Pruebas de Normalidad para los procesos de extracción. ....	38
8.3.3.1.1	Datos de solución acidificada. ....	38
8.3.3.1.2	Datos de Solución sin acidificar. ....	41
8.3.4	Prueba t de Student.....	44
8.3.4.1	Cálculo de Potencia.....	44
8.4	Evaluación del poder tintóreo y estabilidad en el tiempo.....	47
IX.	CONCLUSIONES .....	48
X.	RECOMENDACIONES.....	49
XI.	BIBLIOGRAFÍA .....	50
XII.	ANEXOS .....	53

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla N° 5.1</b> Contenido de Nutrientes relacionado a 100 g de sustancia comestible.....	6
<b>Tabla N° 5.2</b> Sustituyentes de las antocianinas.....	7
<b>Tabla N° 5.3</b> Características generales del ácido cítrico.....	20
<b>Tabla N° 5.4</b> Características generales del etanol.....	20
<b>Tabla N° 8.1</b> Porcentajes de Humedad de las muestras.....	29
<b>Tabla N° 8.2</b> Resultados estadísticos del procesamiento de los Datos de Porcentaje de Humedad.....	30
<b>Tabla N° 8.3</b> Punto Óptimo de extracción de Flor de Jamaica.....	33
<b>Tabla N° 8.4</b> Diferencia de Masa Extraída por sifonadas.....	34
<b>Tabla N° 8.5</b> Datos para la masa extraída.....	36
<b>Tabla N° 8.6</b> Resultados estadísticos del procesamiento de los datos para la solución acidificada.....	38
<b>Tabla N° 8.7</b> Resultados estadísticos del procesamiento de los datos para la solución sin acidificar.....	41
<b>Tabla N° 8.8</b> Análisis de potencia.....	44
<b>Tabla N° 8.9</b> Prueba T de Student para la media con la solución acidificada y sin acidificar.....	45
<b>Tabla N° 8.10</b> Evaluación del poder tintóreo y estabilidad en el tiempo.....	47

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura N° 5.1.</b> Estructura química de las Antocianinas.....	6
<b>Figura N° 5.2.</b> Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH.....	7
<b>Figura N° 5.3.</b> Extracción con Soxhlet en el momento en que se produce el sifonamiento del solvente.....	17
<b>Figura N° 8.1.</b> Grafica para los Porcentajes de Humedad.....	31
<b>Figura N° 8.2.</b> Histograma para los datos de porcentajes de Humedad.....	32
<b>Figura N° 8.3.</b> Curva General de extracción (%Jamaica extraído vs N°Sifonadas).....	34
<b>Figura N° 8.4.</b> Curva de diferencias de masas extraídas por sifonada.....	35
<b>Figura N° 8.5.</b> Gráfica de probabilidad de los datos procesados para la solución de Etanol - Ac.Cítrico.....	39
<b>Figura N° 8.6.</b> Histograma de los datos procesados para la solución Etanol - Ac.Cítrico.....	40
<b>Figura N° 8.7.</b> Gráfica de probabilidad de los datos procesados para el Etanol.....	42
<b>Figura N° 8.8.</b> Histograma de los datos procesados el Etanol.....	43
<b>Figura N° 8.9.</b> Análisis de potencia para la solución acidificada y sin acidificar.....	44
<b>Figura N° 8.11.</b> Diagrama de caja para las masas extraídas.....	45
<b>Figura N° 8.10.</b> Intervalo de Confianza al 95%.....	46

## RESUMEN

El presente trabajo Monográfico consistió en la extracción, a nivel de laboratorio, de los pigmentos colorantes del tipo antocianina contenida en la Flor de Jamaica (*Hibiscus Sabdariffa*).

El método de extracción utilizado en los experimentos fue Lixiviación, utilizando un equipo de extracción Soxhlet. La variable en dichos experimentos fue el tratamiento de la solución extractora, con ácido cítrico y sin acidificación:

- Solución alcohólica acidificada (Etanol al 96% – 0.03 % P/V de ácido cítrico).
- Solución alcohólica sin acidificar (Etanol al 96%)

El equipo de extracción Soxhlet está conformado por un condensador, una cámara superior y una inferior. En la cámara superior se coloca la muestra (Flor de Jamaica) previamente seca y triturada, en cartuchos especiales para el equipo. La cámara de solvente, exactamente abajo, contiene el solvente determinado. Cuando se evapora el solvente llega hasta el área donde es condensado; de aquí el líquido condensado cae sobre los cartuchos que contienen la muestra y cada vez que se llena el sifón de condensación y lixiviado, regresa a la cámara del solvente, obteniendo el colorante de interés.

Este proceso se repite hasta que la muestra quede agotada, siendo necesaria la optimización del número de sifonadas para la extracción. De acuerdo con la Curva (Figura N°8.3.) se encontró que el punto óptimo de extracción es mediante 10 sifonadas por experimento.

En las extracciones se realizaron 20 corridas experimentales, 10 con la solución alcohólica acidificada y las otras 10 con la solución alcohólica sin acidificar.

Las soluciones (extractos) obtenidas, se concentraron al vacío en un Rotavapor a condiciones de 175 mmHg y a una temperatura de 60°C; en donde también se recuperó aproximadamente el 95% del alcohol inicial.

Mediante el análisis estadístico, se logro comprobar que no hay diferencia significativa entre ambos tratamientos.

Finalmente se evaluó el poder tintóreo del colorante mediante pruebas en alimentos. En esta investigación, se utilizo Yogurt Natural y Crema Acida. Se observó que la cantidad de colorante de Flor de Jamaica, necesaria para lograr tinción en ambos productos es mucho mayor que la de los colorantes artificiales que se utilizan actualmente en la industria alimenticia.

## **I. INTRODUCCIÓN**

Los colorantes son sustancias de origen natural o artificial que se usan para aumentar o dar color a los alimentos, telas, tintas y otros. El color es uno de los factores más importantes responsables de la aceptación o rechazo de los alimentos. Las variaciones en la intensidad del color pueden generar en el consumidor la idea de que el alimento estuvo o no sujeto a un proceso mal controlado.

Los colorantes naturales son considerados en general como inocuos y consecuentemente las limitaciones específicas en su utilización son menores que las que afectan a los colorantes artificiales.

Entre los pigmentos naturales más importantes se encuentran las antocianinas o antocianidinas, que pertenecen al grupo de los bioflavonoides; responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul de muchas frutas, vegetales y cereales. Una de las funciones de estos pigmentos es proteger a las plantas, sus flores y sus frutas contra luz ultravioleta (UV). A pesar de las ventajas que ofrecen las antocianinas como potenciales sustitutos de los colorantes artificiales, su baja estabilidad limita su valor comercial.

La dificultad en la difusión del uso masivo de colorantes naturales básicamente radica en su poca estabilidad frente a la luz, por ello los estudios recientes se han enfocado en los métodos de extracción y la búsqueda de estabilidad del mismo (Brucelas & Vicario, Trece Grados, 2012). Entre los métodos de extracción del colorante de las materias primas vegetales y animales destacan aquellas que utilizan solvente (líquido) para extraer el colorante (sólido). Uno de los métodos utilizados es la lixiviación.

La extracción sólido – líquido (Lixiviación) es una operación de la ingeniería química que se usa en numerosos procesos industriales, entre los cuales se encuentra la extracción de pigmentos coloridos. Técnicamente, es una operación de transferencia de masa, donde un disolvente o mezcla de éstos, extraen selectivamente uno o varios solutos que se hallan dentro de una matriz sólida.

La nueva tendencia de consumo de aditivos alimenticios naturales ha desplazado el uso de los artificiales. Con interés en este cambio de paradigma alimenticio, en este estudio se pretende experimentar con la adición de ácido a la solución extractora, para valorar su efecto en el proceso de extracción del colorante natural y la funcionalidad de éste como aditivo alimenticio.



## **II. ANTECEDENTES**

El coloreado artificial de los alimentos es una práctica que data de la antigüedad (IFOOD, 2010), alcanzando su apogeo con el desarrollo de la industria de los colorantes orgánicos de síntesis, en el siglo XIX.

En 1860 se coloreaba el vino en Francia con fucsina; más adelante se colorearon los macarrones y la mantequilla con dinitrocresol, los caramelos y postres con azorrubina, y los postres lácteos con eritrosina. Pero desde mediados del siglo XX la preocupación por la seguridad de los alimentos y la presión de los consumidores, ha llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y sustituir los colorantes artificiales por los naturales.

Los colorantes naturales en comparación con los artificiales, son más vulnerables en cuanto a intensidad de color, estabilidad y conservación de los mismos se refiere. Aunque los colorantes sintéticos son más resistentes que los naturales el uso de ellos también tiene sus inconvenientes, como es el caso de la decoloración por el uso del ácido ascórbico.

En Latinoamérica los países que producen y exportan colorantes naturales son: Argentina, México, Perú, Bolivia, entre otros. Con una demanda creciente por la preferencia y exigencia de los consumidores en que los alimentos sean lo más naturales posibles; en consecuencia, la elaboración de colorantes naturales está también en crecimiento.

A pesar que la obtención de colorantes naturales resulta en un costo de producción mayor, se ha logrado demostrar que no provocan daños al organismo humano y con la nueva tendencia a cuidar del cuerpo y verse bien, se ha incrementado su uso considerablemente.

Se ha encontrado diversos estudios de extracción de colorantes de la Cochinilla, Chile Jalapeño, Maíz Morado y otros, para su uso en la industria textil. (Guzman, 2008).

En el Centro de Documentación de la Facultad de Ingeniería Química, de la UNI, existen reportes de estudios realizados por estudiantes egresados de dicha carrera, en su trabajo final de obtención del título de Ingeniero Químico (Rivera, 2010).

### **III. JUSTIFICACION**

Se ha asumido el reto de extraer colorante a partir de la Flor de Jamaica motivado esencialmente por la ausencia de empresas dedicadas a la producción de colorante natural en Nicaragua. En la industria alimenticia internacional existen empresas que se dedican a la comercialización de colorantes naturales y artificiales, evidenciando que la demanda de colorantes naturales está en crecimiento (CHR HANSEN , 2008), lo cual convierte en atractiva su producción.

Otra razón fundamental para realizar este estudio es la poca experimentación científica en Centroamérica, dedicada a la extracción de colorantes con materias primas locales. En Nicaragua tenemos suficiente materia prima para la realización de este estudio, además contamos con un sin numero de materias primas con las cuales experimentar.

Los colorantes artificiales están siendo sustituidos por los naturales, debido a que diversos estudios han demostrado que estos provocan efectos nocivos en el organismo, tales como la Tartracina que provoca urticaria en menos del 0,01% de la población expuesta a ella, la eritrosina que está relacionada con tumores de tiroides en ratas y la cochinilla que provoca reacciones alérgicas graves, incluso potencialmente fatales, en casos raros. (Pelayo, 2007)

Básicamente, con este estudio tendríamos la oportunidad de realizar la extracción de un colorante natural a partir de la Flor de Jamaica. El extracto colorido tendrá como fin su utilización posterior como aditivo alimenticio; por el cual, éste debe ser inocuo y estable, que no altere las propiedades organolépticas del producto, y que no provoque daños futuros en el organismo.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

- Extraer colorante para uso alimenticio a partir de la Flor de Jamaica, utilizando la Lixiviación como método de Extracción.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Evaluar la condición de humedad como factor importante en la preparación de la Materia Prima.
- Desarrollar experimentalmente la extracción de colorante.
- Comprobar, el efecto del pH de la solución madre, en el rendimiento de la extracción.
- Evaluar el poder tintóreo, y la estabilidad en el tiempo de la coloración aplicado a un alimento específico (Yogurt y Crema ácida).

## **V. MARCO TEORICO**

### **5.1 Flor de Jamaica**

*Hibiscus Sabdariffa*, Rosa de Jamaica o también conocida como Rosa de Abisinia o Flor de Jamaica, es un hibisco de la familia de las Malváceas, originario de África tropical, desde Egipto y Sudán hasta Senegal, aunque, debido a sus propiedades medicinales, se cultiva con éxito en México, América Central, en el Sur y Sudeste Asiático, incluido el Sur de China.

En Nicaragua el cultivo de la Flor de Jamaica es de reciente origen y actualmente las zonas de cultivo se desarrollan en: Granada, Jinotepe, León, Chinandega, Estelí, Nueva Segovia y la Isla de Ometepe.

#### **5.1.1 Propiedades químicas**

El análisis fitoquímico de la Jamaica ha revelado la presencia en ella de ciertas sustancias naturales que se encuentran en las plantas y en la mayoría de aceites vegetales llamadas fitosteroles, además de flavonoides, saponinas y otros glucósidos, además de carbohidratos, ácido ascórbico y una mezcla de ácido cítrico y málico.

La Flor de Jamaica contiene dos pigmentos coloridos: la hibiscina y la gosipitina, que se usan como base natural de jarabes y licores coloridos. Se han identificado los pigmentos extraídos de las flores, como la hibiscina, gosipetrina, quercetina, mirecetina, hibiscetina, hibiscetrina y sabedaretina.

Los principales pigmentos de esta planta son las antocianinas: la cianidina-3-glucósido y la delfinidina- 3-glucósido, que tienen propiedades antioxidantes y que no presentan actividad tóxica ni mutagénica. Se ha demostrado que los compuestos fenólicos –como el ácido procatecuíco, aislado de las flores de esta planta– tienen fuertes propiedades antioxidantes, mientras que el ácido hibiscus manifiesta una elevada actividad inhibitoria sobre ciertas enzimas pancreáticas.

Los componentes de esta planta en términos generales van desde la antocianina, glucósidos, proteínas, calcio, tiamina, carbohidratos, grasas, vitaminas A, E y C, hierro, fósforo, ácido ascórbico, ceniza, caroteno, riboflavina, niacina hasta fibra.

**Tabla N°5.1.**Contenido de Nutrientes relacionado a 100 g de sustancia comestible.

	<b>Cálizes</b>	<b>Semillas</b>	<b>Follaje</b>
<b>Proteína [g]</b>	2,0	28,9	3,5
<b>Carbohidratos [g]</b>	10,2	25,5	8,7
<b>Grasa [g]</b>	0,1	21,4	0,3
<b>Vitamina A I.E</b>	-	-	1000
<b>Tiamina [mg]</b>	0,05	0,1	0,2
<b>Riboflavina [mg]</b>	0,07	0,15	0,5
<b>Niacina [mg]</b>	0,06	1,5	1,4
<b>Vitamina C [mg]</b>	17	-	2,3
<b>Calcio [mg]</b>	150	350	240
<b>Hierro [mg]</b>	3,0	-	5,0

**Fuente:** (Augstburger & Berger, 2000).

### 5.1.2 Aplicaciones

Los extractos de las flores de Jamaica se emplean como colorantes naturales para los alimentos, en emulsiones para las bebidas y en la preparación de mermeladas y gelatinas de color rojo brillante y placentero con un sabor ácido.

La infusión cocción de las flores también se usa como un sustituto del té o el café por personas que sufren de problemas de salud. La Flor de Jamaica, por su fibra y cálices, se emplea asimismo en la manufactura de cordajes y canastas, así como en la preparación de bebidas refrescantes.

La semilla constituye una fuente excelente de aceite de cocina. Los tallos tiernos, hojas y cálices se usan en la preparación de sopas y salsas. Los cálices se ocupan en preparados que se consumen como sustitutos de la carne. Las flores y frutos carnosos se utilizan en infusiones farmacéuticas para aliviar los síntomas de bronquitis y tos.

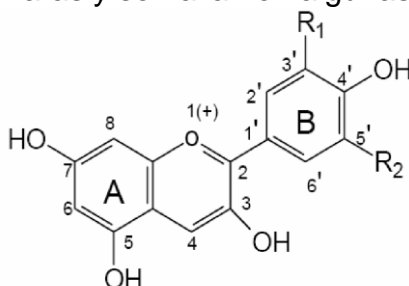
Las antocianinas extraídas de las flores secas de la Jamaica son pigmentos naturales que se usan en la medicina y en la manufactura de alimentos.

## 5.2 Antocianinas<sup>1</sup>

Las antocianinas son un grupo de pigmentos de color rojizo, hidrosolubles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Muchas frutas, hortalizas y flores deben su atractiva coloración a este grupo de sustancias hidrosolubles que existen en el jugo celular.

### 5.2.1 Estructura

Todas las antocianinas se derivan de la estructura básica del catión flavilio (I). Se conocen 20 antocianidinas, pero solo 6, a saber: pelargonidina (II), cianidina (III), delphinina (IV), pertunidina (VI) y malvidina (VII) son importantes en los alimentos. Las otras son comparativamente raras y se hallan en algunas flores y hojas.



**Figura N°5.1.** Estructura química de las Antocianinas.

**Tabla N°5.2.** Sustituyentes de las antocianinas

Aglicona	Substitución		$\lambda_{\text{max}}$ (nm) espectro visible
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

**Fuente:** Durst y Wrolstad, 2001.

Los pigmentos de antocianina se componen de aglicona (antocianidina) esterificada con uno o más azúcares. Las agliconas libres raramente existen en los alimentos, excepto posiblemente como componentes traza de las reacciones de degradación.

Solamente se han hallado cinco azúcares como parte de las moléculas de antocianinas. Son, en orden de abundancia relativa, la glucosa, ramnosa, galactosa, xilosa y arabinosa. Las antocianinas también pueden ser aciladas lo cual añade un tercer componente a la molécula de azúcar. Se encuentran una o más moléculas de ácido *p*-cumarico, ferulico, cafeico, malónico, vanílico o acético.

<sup>1</sup> FENNEMA, 2010

Las antocianinas (FENNEMA, 2010) se pueden dividir en grupos que dependen del número de moléculas de azúcar. Los monosidos tienen solo un residuo de azúcar, casi siempre en la posición 3. Los biosidos contienen 2 azúcares, ambos en posición 3 o uno en la posición 3 y otro en la posición 5, o más raramente en las posiciones 3 y 7. Los triosidos contienen 3 azúcares, ordinariamente dos en la posición 3 y uno en la posición 5, a menudo tres en una estructura ramificada o lineal en la posición 3, o más raramente, dos en la posición 3 y uno en la posición 7. No se han descrito antocianinas con cuatro restos de azúcar, pero hay cierta evidencia de su existencia.

Se han señalado la existencia de una antocianina con 5 moléculas de azúcar y 4 componentes acilo. En la bibliografía se han descrito aproximadamente 140 antocianinas.

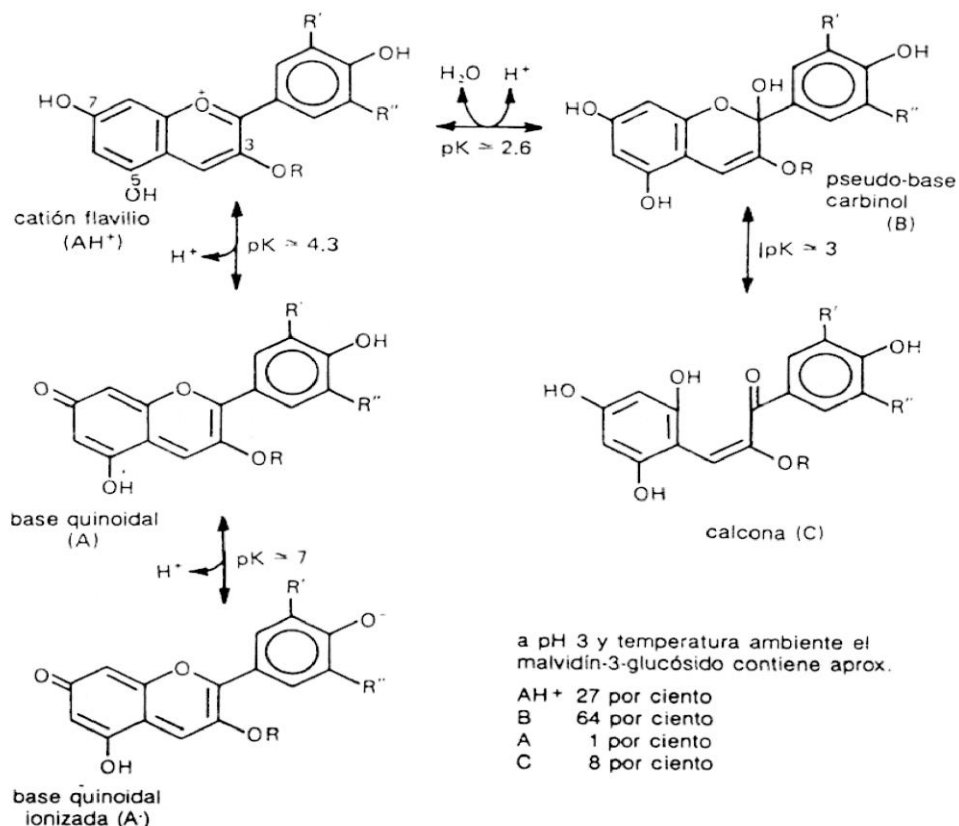
### **5.2.2 Estabilidad en los alimentos**

El núcleo flavilio de los pigmentos de antocianina es deficiente en electrones y, por tanto, muy reactivo. Las reacciones ordinariamente comprenden decoloración de los pigmentos y son casi siempre no deseables en el procesamiento de frutas y hortalizas. La velocidad de la destrucción de las antocianinas depende del pH y es rápida a valores de pH elevados. La velocidad de reacción depende de la cantidad de pigmento existente en forma base carbinol incolora y es dependiente de la temperatura. La reactividad de la molécula de antocianina con el aire y con muchos de los componentes normalmente en las frutas y hortalizas ha dado a lugar numerosos estudios sobre la estabilidad de las antocianinas.

### **5.2.3 Efecto del Ph**

El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas. La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula. En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos, básicamente 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ión oxonio o catión flavilio (AH<sup>+</sup>) de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemiacetal (B) y la forma chalcona (C), o de cadena abierta. Tanto el hemiacetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables.

A valores de pH superiores a siete se presentan las formas quinoidales (A, A<sup>-</sup>) de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire. (Garzón, 2008)



**Figura N°5.2.** Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH.

### 5.2.3.1 Grados Dornic.

Los grados Dornic se expresa como la cantidad de Ácido láctico presente en la leche. Es el número de décimos de mililitros de solución de hidróxido de sodio N/9, usado para neutralizar la acidez de 1 mL de leche, resultante de la degradación de la lactosa por la acción de los microorganismos y eventualmente de los lípidos, en las leches en vias de alteración, utilizando como indicador la fenolftaleína. Decimas de NaOH N/9, necesarios para neutralizar 10 cc de leche.

$$^{\circ}D = 1\text{mg Ac. Láctico}/10\text{ cc leche}$$

### 5.2.4 Efecto de la temperatura

Incrementos de temperatura resultan en pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras.



### **5.2.5 Efecto del oxígeno y el ácido ascórbico**

El efecto degradativo del oxígeno y el ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas está demostrado. Se reportaron que las condiciones que favorecen la oxidación aeróbica del ácido ascórbico en jugo de fresa y en sistemas modelo que contenían pelargonidina 3-glucósido proveniente de la fresa causaban grandes pérdidas de antocianinas, pero cuando el oxígeno era excluido del sistema no se observaba deterioro del color. De igual manera, se reportaron un efecto sinérgico entre el ácido ascórbico y el oxígeno sobre la degradación de la pelargonidina 3-glucósido en solución. En investigaciones más recientes, Garzón y Wrolstad, 2002, confirmaron la aceleración de la destrucción de antocianinas de fresa cuando el ácido ascórbico está presente tanto en sistemas naturales como en sistemas modelo. El efecto del ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas ha sido explicado por Jurd, 1972, y Poei-Langston, 1981, como una posible reacción de condensación entre el ácido y los pigmentos.

### **5.2.6 Derivados de antocianidina**

Las restricciones al empleo de colorantes alimentarios artificiales rojos ha despertado el interés en la utilización como colorantes de los alimentos de compuestos tipo antocianina, se han descrito una serie completa de compuestos que difieren en los sustituyentes en la posición 3, que han sido patentado, pero desgraciadamente sufren reacciones con el dióxido de azufre, ácidos ascórbico, pH y otros agentes. Timberlake y Bridle informaron recientemente que las antocianidinas con un grupo metilo o fenilo en la posición 4 son muy estables en presencia de compuestos, inclusive más que los colorantes artificiales rojos permitidos. Sin embargo, esta clase de compuestos flavilio en posición 4 tendrá que ser considerada como compuestos nuevos y, por tanto, sometida a las correspondientes pruebas de toxicidad.

## **5.3 Colorantes**

Un colorante se puede definir como un pigmento o sustancia que cuando se añade o se aplica a un alimento, fármaco o cosmético, o para el cuerpo humano, es capaz (solo o por medio de reacciones con otras sustancias) de impartir color.

Los colorantes son pertenecientes a un extenso grupo de sustancias, que son empleados para colorear productos que han perdido su color por el tratamiento industrial o para hacerlo más agradable a la vista y apetecible al consumidor. En la industria se amplía el concepto de colorantes a los productos que contienen colorantes orgánicos puros junto con agentes reductores o de relleno que los hacen más manejables.

Los colorantes suelen confundirse con los pigmentos, que son sustancias polvorosas de color que precisan mezclarse con agentes adhesivos antes de aplicarse a una superficie. Tampoco se debe confundir con una tintura, el cual constituye un pigmento o colorante químico, disuelto en un vehículo (agua, alcohol, o aceites), empleado para colorear vidrio, papel, tejidos o maderas.

### **5.3.1 Clasificación de los Colorantes**

#### **Por su origen:**

- Colorantes orgánicos: procedentes de plantas y animales, tales como la clorofila, carotenos, riboflavina, etc., estos colorantes son extraídos por diversos métodos (fermentación, tostado, etc.).
- Colorantes minerales: tales como lacas, sulfato de cobre, cromato de plomo, etc., que actualmente no son utilizados en alimentación por llevar iones metálicos.
- Colorantes artificiales.

#### **Por su composición:**

- Derivados isoprénicos (carotenoides).
- Derivados tetrapirólicos (clorofilas).
- Derivados de benzopirano (antocianos y otros flavonoides).

#### **Por su solubilidad:**

- Hidrosolubles (solubles en agua).
- Liposolubles (solubles en la grasa).
- Insolubles.

Los colorantes pueden clasificarse atendiendo a sus aplicaciones o por su estructura química. La clasificación química suele determinarse por el núcleo del compuesto. Entre los grupos más importantes de colorantes están los azocolorantes, que incluyen el amarillo mantequilla y el rojo congo; los trifenilmetanos, que incluyen el color magenta y el violeta metilo; las ftaleínas; las azinas, que incluyen el color malva, y las antraquinonas, que incluyen la alizarina. El índigo es un colorante de tina que se da en la naturaleza en un glucósido cristalino llamado indicán.

Otro grupo importante lo constituyen las ftalocianinas, de color azul o verde, con una estructura química semejante a la clorofila. Los azocolorantes son los más empleados.

Una de las clasificaciones más utilizadas es la que los divide en dos grandes grupos según su procedencia:

- Naturales.
- Sintéticos o Artificiales.

### 5.3.2 Colorantes Naturales

Como su nombre lo dice, son sustancias naturales que se añaden para dar o devolver algún color. Se encuentran presentes como pigmentos en plantas, hojas y frutos.

La distinción entre colorante natural y artificial, es un término muy grande puesto que los colorantes naturales tienen que ser tratados químicamente para ser estables, identificables y con tono uniforme. En sentido estricto, solo sería natural el color que un alimento tiene por sí mismo, esto puede generalizarse a los colorantes presentes de forma espontánea en otros alimentos y extraíbles de ellos, pero puede hacer confusa la situación de aquellas sustancias totalmente idénticas pero obtenidas por síntesis química, también la de colorantes obtenidos de materiales biológicos no alimentarios, insectos, por ejemplo, y la de aquellos que pueden bien añadirse o bien formarse espontáneamente al calentar un alimento, como es el caso del caramelo.

Los colorantes naturales son considerados en general como inocuos y consecuentemente las limitaciones específicas en su utilización son menores que las que afectan a los colorantes artificiales, son permitidos sin restricciones.

Los colorantes naturales se pueden dividir en los siguientes grupos:

- **Colorantes naturales:** Productos que se adicionan a los alimentos para proporcionarles un color específico y hacerlos más agradables a la vista.
- **Tintes naturales:** Son los productos utilizados para el teñido de telas, madera, fibras y cuero.
- **Pigmentos naturales:** Compuestos responsables del color de una planta, utilizados principalmente por la industria farmacéutica.

### 5.3.3 Colorantes artificiales

Son los obtenidos por síntesis química, de los que actualmente se conocen más de 3,000 aunque la lista de los utilizados en alimentación es muy reducida (menos del 10%).

Los colorantes artificiales son tan utilizados por sus excelentes propiedades:

- Proporcionan un color persistente (resistente a ataques).
- Ofrecen colores variados y uniformes.
- Son de alta pureza y bajo costo.
- Se pueden obtener en grandes cantidades.

Al igual que la mayoría de los productos adulterados, el uso de estos colorantes en la industria alimenticia también trae consigo desventajas, cobran miles de víctimas por intoxicación y causan muchas enfermedades, es por ello que se ha ido desplazando el uso de estos, siendo sustituidos por colorantes naturales.

#### **5.3.4 Colorantes alimenticios**

Las formulas químicas de los colorantes alimentarios suelen ser muy diferentes y es difícil encontrar una clasificación adecuada, aunque se pueden distinguir a que grupos pertenecen según su estructura química: azoicos, xanténicos, quinoleínicos, trifenilmetánicos, indigoides, ftalocianínicos, etc.

Los colorantes de síntesis deben reunir una serie de características, para asegurar su buen uso.

**Según la bibliografía (Juran, 2005) los requisitos necesarios son:**

1. Ser inocuo.
2. Constituir una especie química definida y pura.
3. Tener gran poder tintorial, con objeto de utilizar la mínima cantidad posible
4. Ser fácilmente incorporables al producto.
5. Ser lo más estable posible a la luz y al calor.
6. Poseer compatibilidad con los productos que deben teñir.
7. No poseer olor ni sabor desagradables.
8. Ser indiferente pH, agentes oxidantes y reductores.
9. Ser lo más económico posible.

#### **Factores que contribuyen a la inestabilidad**

- Trazas de metales
- Altas temperaturas
- Agentes óxido-reductores
- Luz
- pH

#### **5.4 Humedad en los alimentos.**

Todos los alimentos, contienen agua en mayor o menor proporción. Las cifras de contenido en agua varían entre un 60 y un 95% en los alimentos naturales. En los tejidos vegetales y animales, puede decirse que existe en dos formas generales: “agua libre” Y “agua ligada”. El agua libre o absorbida, que es la forma predominante, se libera con gran facilidad. El agua ligada se halla combinada o absorbida. Se encuentra en los alimentos como agua de cristalización (en los hidratos) o ligada a las proteínas y a las moléculas de sacáridos y absorbida sobre la superficie de las partículas coloidales.

#### **5.4.1 Métodos de secado.**

Los métodos de secado son los más comunes para valorar el contenido de humedad en los alimentos; se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso debida a su eliminación por calentamiento bajo condiciones normalizadas. Aunque estos métodos dan buenos resultados que pueden interpretarse sobre bases de comparación, es preciso tener presente que:

- a) Algunas veces es difícil eliminar por secado toda la humedad presente.
- b) A cierta temperatura el alimento es susceptible de descomponerse, con lo que se volatilizan otras sustancias además de agua.
- c) También pueden perderse otras materias volátiles aparte de agua

#### **5.5 Métodos de extracción Sólido- Líquido**

Los métodos en esta categoría son adsorción- desorción, secado y lixiviación. La adsorción comprende el contacto de sólidos con líquidos o gases y la transferencia de masa en la dirección fluido a sólido. La transferencia de masa se efectúa en dirección opuesta con respecto a su operación compañera, la desorción; la combinación es análoga a la absorción-desorción de gases. El secado abarca el contacto gas-sólido, la lixiviación el contacto líquido-sólido; en cada caso, ocurre la transferencia de masa en la dirección sólido a fluido; por tanto se trata de casos especiales de la desorción.

##### **5.5.1 Lixiviación.**

La extracción sólido líquido o Lixiviación es una operación de transferencia de masa, donde un disolvente o mezcla de éstos, extraen selectivamente uno o varios solutos que se hallan dentro de una matriz sólida. El proceso completo de extracción suele comprender la recuperación por separado del solvente y del soluto.

Al igual que en la destilación, existen una serie de parámetros físico - químicos, tales como la viscosidad del disolvente, los coeficientes de solubilidad de los solutos, las temperaturas de ebullición, etc. que son de importancia fundamental para el diseño del equipo y el éxito del proceso de extracción.

La extracción sólido-líquido tiene gran importancia en un gran número de procesos industriales, en metalurgia en la extracción de: cobre con ácido sulfúrico, oro con cianuro, entre otros. Muchos productos orgánicos naturales se separan de sus estructuras originales mediante Lixiviación. Por ejemplo el azúcar se separa por Lixiviación de la remolacha con agua caliente; los aceites vegetales se recuperan a partir de semillas, como las de soya y algodón mediante Lixiviación con disolventes orgánicos. El té y el café se preparan mediante técnicas y equipo muy similares a los utilizados en las verdaderas operaciones de Lixiviación. Además, los precipitados químicos con frecuencia se lavan de sus aguas madres adheridas mediante técnicas y equipo muy similares a los utilizados en las verdaderas operaciones de Lixiviación, como en el lavado de licor de sosa cáustica del carbonato de calcio precipitado

después de la reacción entre óxido de calcio y carbonato de sodio. (Treybal, Operaciones de Transferencia de Masa, 1988)

#### **5.5.1.1 Lixiviación discontinua**

La separación de una mezcla de compuestos sólidos se puede llevar a cabo aprovechando diferencias de solubilidad de los mismos en un determinado disolvente. En el caso favorable de una mezcla de sólidos en la cual uno de los compuestos es soluble en un determinado disolvente (normalmente un disolvente orgánico), mientras que los otros son insolubles, podemos hacer una extracción consistente en añadir este disolvente a la mezcla contenida en un vaso de precipitados o un matraz, en frío o en caliente, agitar o triturar y macerar de ser necesario para finalmente separar por filtración la disolución que contiene el producto extraído y la fracción insoluble que contiene las impurezas.

#### **5.5.1.2 Lixiviación Continua**

La extracción sólido-líquido suele ser mucho más eficiente cuando se hace de manera continua con el disolvente de extracción caliente en un sistema cerrado, utilizando una metodología similar a la basada en la maceración con disolvente orgánico, previamente vaporizado en un matraz y condensado en un refrigerante, de la mezcla sólida a extraer contenida dentro de un cartucho o bolsa de celulosa que se coloca en la cámara de extracción. El paso del disolvente orgánico con parte del producto extraído al matraz inicial, permite que el mismo disolvente orgánico vuelva a ser vaporizado, repitiendo un nuevo ciclo de extracción, mientras que el producto extraído, no volátil, se va concentrando en el matraz.

#### **5.5.1.3 Preparación del sólido**

El éxito de una lixiviación y la técnica que se va a utilizar dependen con mucha frecuencia de cualquier tratamiento anterior que se le pueda dar al sólido. La trituración y molienda de estos sólidos acelerará bastante la acción de lixiviación, porque las porciones solubles son entonces más accesibles al disolvente.

Los cuerpos vegetales y animales tienen una estructura celular, los productos naturales que se van a lixiviar a partir de estos materiales se encuentran generalmente dentro de las células. Si las paredes celulares permanecen intactas después de la exposición a un disolvente adecuado, entonces en la acción de lixiviación interviene la ósmosis del soluto a través de las paredes celulares. Éste puede ser un proceso lento. Sin embargo, moler el material lo suficientemente pequeño como para liberar el contenido de las células es poco práctico y algunas veces indeseable.

#### **5.5.1.4 Temperatura de Lixiviación.**

Las temperaturas elevadas producen una mayor solubilidad del soluto en el disolvente y, en consecuencia, concentraciones finales mayores en la extracción. A temperaturas elevadas la viscosidad del líquido es menor y mayores las difusividades; esto incrementa la rapidez de la extracción. En el caso de algunos productos naturales, como la Flor de Jamaica, las temperaturas muy elevadas pueden producir la extracción de cantidades excesivas de solutos indeseables o de deterioro químico del sólido.

#### **5.5.1.5 Equipos utilizados para la Lixiviación.**

Existe variedad de equipos utilizados para la Lixiviación. Entre ellos los extractores de lecho fijo (percolación, inmersión) de lecho móvil, continuos de bandejas, etc., estos son algunos de los tipos que se usan normalmente en la industria.

##### **5.5.1.5.1 Extractores de Lecho Estático o Fijo.**

Son sistemas en los que la fase solida permanece estática durante la extracción, haciéndose circular el disolvente a través del lecho de partículas sólidas (percolación, inmersión).

##### **5.5.1.5.2 Extractores De Lecho Móvil.**

En ellos, las fases solidas se encuentran también en movimiento, por lo que operan de forma continua. Entre los más señalados:

###### **5.5.1.5.2.1 Extractor de columna con agitación.**

En el que la mezcla solida se carga por la parte superior, descendiendo por gravedad. El disolvente se introduce por la parte inferior, circulando en contracorriente con el sólido. Dispone, además, de un eje central rotatorio dotado de paletas, que permite agitar la mezcla y delimitar etapas de extracción.

###### **5.5.1.5.2.2 Extractor de tornillo.**

En el que el desplazamiento del solido se produce por un tornillo helicoidal situado en el interior, que posibilita la circulación en contracorriente con el disolvente.

En la industria de los procesos naturales, ya con fines analíticos a escala de producción, se utiliza con frecuencia el extractor sólido - líquido tipo Soxhlet.

En pleno siglo XXI la tecnología nos ha presentado equipos tan sofisticados como el Soxtest que son totalmente automatizados, sin embargo el principio que los rige no cambia, sigue siendo el de la Extracción Sólido – Líquido.

### **5.5.2 Extracción con Equipo Soxhlet**

El equipo Soxhlet es uno de los más utilizados para la extracción, se aplica a analitos que no se pueden separar por volatilización (en fase gas) pero sí son extraíbles empleando un disolvente orgánico adecuado. La gran ventaja del Soxhlet es la eficacia en el proceso de remojo de la fase sólida. (Nuñez, 2008)

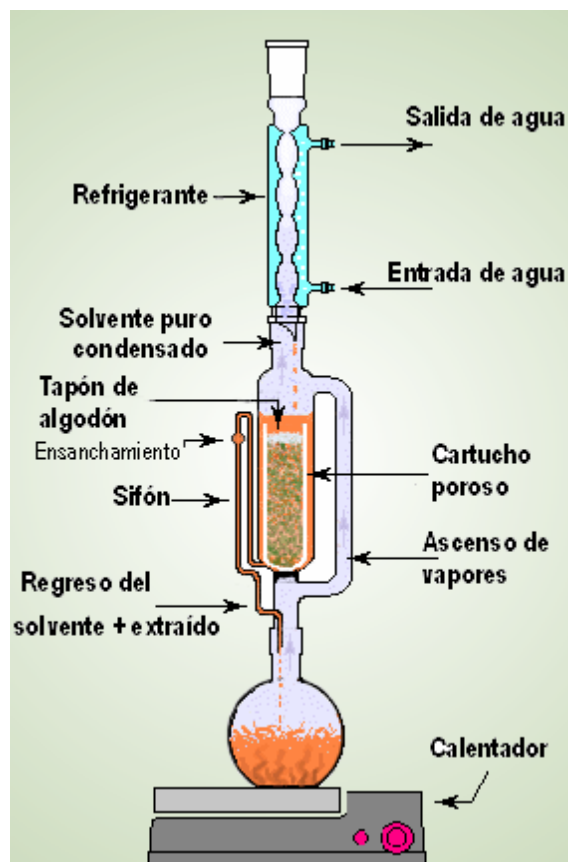
El esquema del instrumento es sencillo:

1. Un matraz de base redonda que contendrá el disolvente orgánico volátil.
2. Un contenedor intermedio de vidrio en el cual se coloca la muestra dentro de un cartucho que está abierto en su parte superior siendo poroso al disolvente y a la posterior disolución del analito.
3. Refrigerante.

El matraz es calentado con una manta calefactora hasta que el disolvente orgánico se evapora, el vapor de disolvente atraviesa el cartucho que contiene la muestra ascendiendo por el contenedor hasta el refrigerante. Cuando el vapor de disolvente llega al refrigerante este condensa y cae en forma líquida de nuevo en dirección al matraz pero, en su camino, este golpea con la muestra disolviéndola (para que esto ocurra la muestra debe estar perfectamente seca y finamente dividida). El analito disuelto en disolvente orgánico pasa por un sifón el cual, al llenarse y desbordar, descarga sobre el matraz redondo.

Cuando el proceso de disolución se da por finalizado se añade una última etapa: la evaporación. El disolvente se evapora por calentamiento concentrando la muestra.





**Figura N°5.3.** Extracción con Soxhlet en el momento en que se produce el sifonamiento del solvente.

#### 5.5.2.1 Ventajas del uso del Extractor Soxhlet

- El disolvente y la muestra están en contacto íntimo y repetido. De manera que se mejora muchísimo la extracción porque siempre se emplea un disolvente limpio.
- El disolvente proviene de una condensación y está caliente. Favoreciendo de manera la solubilidad del analito.
- No se requiere filtración posterior. El disolvente orgánico se evapora quedando sólo analito.
- Gran capacidad de recuperación.
- Instrumentación simple

### **5.5.2.2 Desventajas del uso del Extractor Soxhlet.**

- Es un proceso extremadamente lento e imposible de acelerar.
- Se requiere gran cantidad de disolvente.
- Inaplicable a analitos termolábiles, que se descompongan con el calor o reaccionen.
- Necesidad de etapa final de evaporación.
- El método no depende de la matriz sólida.

## **5.6 Estabilizador de pH.**

El pH se define como el logaritmo negativo de base 10 de la actividad de los iones hidrógeno:

$$pH = -\log_{10}[a_{H_3O^+}]$$

Una pequeña variación en el pH significa un importante cambio en la concentración de los iones hidrógeno. El pH es una medida que se usa para indicar la acidez o alcalinidad de una sustancia. Oscila entre los valores de 0 a 14. Para valores de 0 a 6 (más ácido) su constitución está dirigida a los iones hidrógeno ( $H^+$ ). Valor de 8 a 14 (más básico) su constitución es dirigida mayor parte a la concentración de iones  $OH^-$ . El valor 7 indica que es neutro.

### **5.6.1 Ácido cítrico**

El ácido cítrico se obtiene mediante fermentación, usando carbohidratos naturales, tales como azúcar y dextrosa como sustratos, y *Aspergillus Niger* como organismo de fermentación. (Medrano, 2010)

Por sus propiedades conservantes y antioxidante es uno de los aditivos más utilizados por la industria alimentaria. Sus funciones son como agente secuestrante, agente dispersante y acidificante.

#### **5.6.1.1 Características generales**

La acidez del ácido cítrico es debida a los tres grupos carboxilos  $-COOH$  que pueden perder un protón en las soluciones. Si sucede esto, se produce un ion citrato. Los citratos son unos buenos controladores del pH de soluciones ácidas. Los iones citrato forman sales con muchos iones metálicos.

El ácido cítrico es un polvo cristalino blanco. Puede existir en una forma anhidra, o como monohidrato que contenga una molécula de agua por cada molécula de ácido cítrico. La forma anhidra se cristaliza en el agua caliente, mientras que la forma monohidrato cuando el ácido cítrico se cristaliza en agua fría. El monohidrato se puede convertir a la forma anhidra calentándolo sobre  $74\text{ }^{\circ}C$ .

En la tabla N°5.3 se presentan las características generales del ácido cítrico.

**Tabla N°5.3.** Características generales del ácido cítrico.

<b>Formula</b>	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>
<b>Peso molecular</b>	192.13
<b>Apariencia</b>	Cristales blancos
<b>Sabor</b>	Sabor ácido
<b>Olor</b>	Prácticamente sin olor
<b>Solubilidad (gr./100 ml a 25°C)</b>	en agua : 162 en etanol: 59 en éter : 0.75
<b>Punto de fusión:</b>	153°C

## 5.7 Etanol.

Es un líquido incoloro, fácilmente inflamable, arde con llama azulada pálida. Su solubilidad en el agua es en todas las proporciones, siendo además soluble en diversas sustancias orgánicas e inorgánicas cuando se mezcla en estado anhidro.

El etanol es obtenido mediante la destilación y rectificación de productos provenientes de sustancias fermentables permitidas. La materia prima de la que proviene tiene sabor y olor imperceptible, es por ello que predomina el olor y sabor ardiente característico.

La graduación alcohólica alcanzada durante su destilación no debe ser menor de 96% v/v a 20°C. Presentando un máximo de cogenéricos del orden de 10 miligramos/100 mililitros de alcohol anhidro.

En la tabla N°5.4 se puede observar las características generales del etanol.

**Tabla N°5.4.** Características generales del etanol.

<b>Grado alcohólico a 20°C</b>	96.° g.l.
<b>Gravedad específica a 20/20°C</b>	0.8089
<b>Ácidos totales, como ácido acético en mgr/100 mls.</b>	1.8
<b>Aldehídos, como acetaldehídos, en mgr/100 mls.</b>	1.0
<b>Esteres, como acetato de etilo, en mgr/100 mls.</b>	6.5
<b>Residuo no volátil, en mgr.</b>	0.1
<b>Peso molecular</b>	46.0
<b>Punto de ebullición</b>	78.32°C
<b>Punto de inflamación</b>	12.00°C
<b>Punto de congelación</b>	- 130.0°C
<b>Tensión de vapor a 20°C</b>	44.0mmhg
<b>Calor específico a 20°C</b>	0.615 kg-cal.
<b>Calor latente</b>	209.0 kg-cal.

## **5.8 Capacidad de tintura**

La capacidad de tinción se puede expresar como la velocidad con que el colorante es absorbido, por el alimento, en una unidad de tiempo.

Este tiempo se toma como el necesario para que el alimento absorba la mitad de colorante que debiera absorber para el estado de equilibrio; es decir, que en interior del alimento haya tanto colorante como para saturarlo y que la tintura se detenga.

Los factores influyentes en la velocidad de la tintura son, por tanto, aquellos que actúan sobre el factor tiempo. Los otros factores son de tipo mecánico, que modifican la superficie de contacto colorante/alimento: agitación del baño, agitación del alimento, relación entre volumen del baño y peso de alimento, diámetro-sección de hilos, etc.

## **VI. HIPOTESIS**

Para el estudio de extracción de colorantes se han definido las siguientes hipótesis:

Hipótesis Nula: La modificación del pH de la solución madre, no influye en el rendimiento de la extracción de colorante natural de la flor de Jamaica.

Hipótesis Alternativa: La modificación del pH de la solución madre, si influye en el rendimiento de la extracción de colorante natural de la flor de Jamaica.

## **VII. MATERIAL Y MÉTODO**

### **7.1 Materia Prima**

Se utilizó Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) previamente deshidratada. La flor seca se adquirió en el Centro Comercial Campesino del Departamento de Managua (Anexo Figura N° 1.)

### **7.2 Equipos, materiales y reactivos.**

#### **7.2.1 Equipos**

##### **7.2.1.1 Balanza electrónica (portátil).**

Instrumento que sirve para pesar o más exactamente para medir masa. En el caso de las de tipo portátiles, tienen una gran vida útil debido a que fueron confeccionadas para soportar toda clase de golpes y poder realizar las mediciones en distintas superficies sin perder la exactitud, además por razones obvias, son pequeñas para su fácil manipulación. (Anexo Figura N° 2.)

##### **7.2.1.2 Horno secador**

Los hornos son utilizados en el Laboratorio para el secado de material y para secar sales químicas, regularmente sus temperaturas oscilan de 60°C a 300°C. La circulación del aire asegura una intensa transmisión del calor, y por lo tanto, un secado más rápido. Un orificio de salida de aire, en la pared superior (en el techo) asegura una renovación continua del aire.

##### **7.2.1.3 Horno secador/ mufla:**

Utilizadas en laboratorios para realizar pruebas de calcinamiento de muestras, incineración, tratamientos térmicos, entre otros. El horno se calienta por cuatro resistencias eléctricas que están incrustadas en un material refractario. La cámara está cercada con un aislamiento de fibra cerámica. La cámara de control se encuentra bajo la cámara del horno y es así aislado del calor generado en la cámara del horno. Un interruptor de seguridad de la puerta quita la alimentación a los elementos calefactores siempre que la puerta del horno se abre. (Anexo Figura N°3.)

##### **7.2.1.4 Procesador de alimentos**

Utilizado para la reducción de tamaño del material a lixiviar. La base de la unidad alberga un motor que hace girar un eje vertical. Un tazón, normalmente fabricado de plástico transparente, encaja en este eje. Las cuchillas de cortar pueden acoplarse al eje, de forma que giren cerca del fondo del bol. Una tapa impide la salida de los alimentos procesados. Tienen mecanismos de seguridad para evitar que el motor funcione si el tazón no está correctamente encajado a la base o si la tapa no está correctamente sujeta al bol. (Anexo Figura N°4.)

#### **7.2.1.5 Extractor Soxhlet**

Utilizado para la extracción sólido-líquido, está provisto de una chaqueta con espigas para la entrada y salida del agua de enfriamiento, conformado por un cilindro de vidrio, el cual sostiene el cartucho de celulosa que contiene el sólido de donde se extraerá los compuestos, y por un balón de destilación en el que se encuentra el solvente. (Anexo Figura N°5)

#### **7.2.1.6 Rotavapor**

Se utiliza para la concentración del extracto y recuperación del solvente. Consiste en un motor eléctrico que produce el giro de un tubo con un ajuste esmerilado al que se acopla un balón de fondo de pera que contiene la disolución. Dicho balón se sumerge parcialmente en un baño de agua termostado, manteniendo el giro. Acoplado al sistema, se encuentra un refrigerante por el que circula un líquido que produce la condensación del disolvente que se recoge en un balón colector. Todo el sistema tiene acoplado una bomba de vacío. (Anexo Figura N°7.)

#### **7.2.1.7 pH metro**

Consta de una celda para la medida de pH consiste en un par de electrodos, uno de calomel (mercurio, cloruro de mercurio) y otro de vidrio, sumergidos en la disolución de la que se quiere medir el pH.

#### **7.2.2 Materiales**

- Espátulas
- Probeta (10 y 100 ml)
- Pizeta
- Beakers (400 y 600 ml)
- Embudos de vidrio.
- Matraces (250 y 500 ml)
- Unidades de Extracción Soxhlet, integradas por balón, extractor y refrigerante
- Balones de extracción para Rotavapor de fondo redondo de 250 ml. NS 29/32
- Balones de extracción para Rotavapor fondo de pera de 50ml. NS 19/22
- Balón recuperador para Rotavapor S 35
- Frascos de Vidrio (500 ml)
- Viales de Vidrio (25 ml)
- Termómetro (capacidad de 100 °C/ 212 °F)

#### **7.2.3 Reactivos**

- Alcohol etílico 96°
- Ácido cítrico
- Agua destilada

### **7.3 Metodología**

#### **7.3.1 Preparación de la muestra.**

##### *Acondicionamiento de la humedad.*

Para la preparación de la muestra se seleccionó la materia prima adecuada, separando la Flor que se consideraba material de segunda por su aspecto visible color marrón y de partículas extrañas tales como tierra, hojas etc.; se continuó con un pesado de aproximadamente 46 gr de Flor de Jamaica, que luego fue al horno secador con el objetivo de reducir el contenido de humedad y poder lograr su posterior pulverización.

El proceso de secado se realizó en una Mufla (Anexo Figura N°3.) a una temperatura de 45 °C por 12 horas continuas, debido a que a temperaturas mayores la Flor de Jamaica se deteriora rápidamente y afecta en la coloración del extracto.

Por medio de la siguiente ecuación, se obtuvo el porcentaje de Humedad de las muestras de Flor de Jamaica:

$$\%H = \frac{gH_2O \text{ evaporada}}{\text{Masa de muestra en gramos}} \times 100 \quad (7.3.1)$$

Una vez encontrado el porcentaje de humedad en la materia prima, se procedió a pulverizar la muestra, esta operación se realizó en un procesador de alimentos (Anexo Figura N°4), con el objetivo principal de disminuir el tamaño de las partículas, que posteriormente llenaran el cartucho de celulosa que se utilizara en la extracción.

#### **7.3.2 Extracción**

El método de extracción fue Lixiviación. En el proceso, se utilizó un equipo Soxhlet (Anexo Figura N°5). Se realizaron las pruebas preliminares para encontrar el punto óptimo de extracción y determinar el número de sifonadas con las cuales se extraiga todo el pigmento de la Flor de Jamaica. (Tabla N° 8.3).

En este procedimiento se colocó 39.00 gr de la materia prima (Flor de Jamaica) ya pulverizada en un cartucho de material poroso que se situó en la cámara del extractor. Se calentó 400 ml del disolvente extractante, en el matraz de 500ml; teniendo como variable la solución extractora (Etanol o Etanol con Acido cítrico); cuando este alcanza su temperatura de ebullición se evapora hasta llegar al refrigerante del equipo, condensándose y cayendo gota a gota sobre el cartucho que contenía la muestra de flor de Jamaica, extrayendo así los analitos solubles. Cuando el nivel del disolvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el disolvente, con los analitos disueltos, descendió por el sifón y retorno al matraz de ebullición. Este proceso se repitió 10 veces hasta que se completó la extracción de los analitos de la muestra y se concentró en el disolvente.

Se obtuvieron 20 extractos en total, 10 de ellos con ácido cítrico que sirvió para estabilizar el color y los otros 10 sin ácido. Todos los extractos con un volumen



aproximado de 350 ml, los cuales fueron colocados en frascos de vidrio de 500 ml envueltos en papel de aluminio para protegerlos de la luz y se guardó a temperatura de refrigeración (2-6°C) hasta su posterior utilización.

### **7.3.3 Concentración del extracto**

Se recurrió a un Rotavapor BUCHI (Anexos Figura N°7.) Las condiciones a que se operó el equipo, fueron las designadas en el manual de operación para el alcohol etílico: una temperatura de 60°C y una presión de vacío de 175 mmHg, a 100 RPM, esto permitió que la porción alcohólica de los extractos sean removidos sin la necesidad de aplicar calor excesivo y logrando así concentrar las muestras obtenidas.

Se obtuvieron 20 extractos concentrados en total, 10 con ácido cítrico y 10 sin acidificar, con un volumen aproximado de 15 ml, los cuales fueron colocados en viales de 20 ml envueltos en papel de Kraft para protegerlos de la luz y se guardó a temperatura de refrigeración(2-6°C) hasta su posterior análisis. (Anexos Figura N°8.)

### **7.3.4 Evaluación del poder tintóreo y estabilidad en el tiempo.**

Se tomó como base para la experimentación de 200 gr. de Yogurt natural y 200 ml de Crema ácida. Se midió el pH al Yogurt natural y el ° Dornic a la crema ácida, antes de la aplicación del colorante (extracto concentrado).

El colorante se añadió al tanteo y mediante agitación continua, se inició con la adición 1 ml de colorante llegando hasta 2ml, hasta lograr observar tinción en el alimento aplicado.

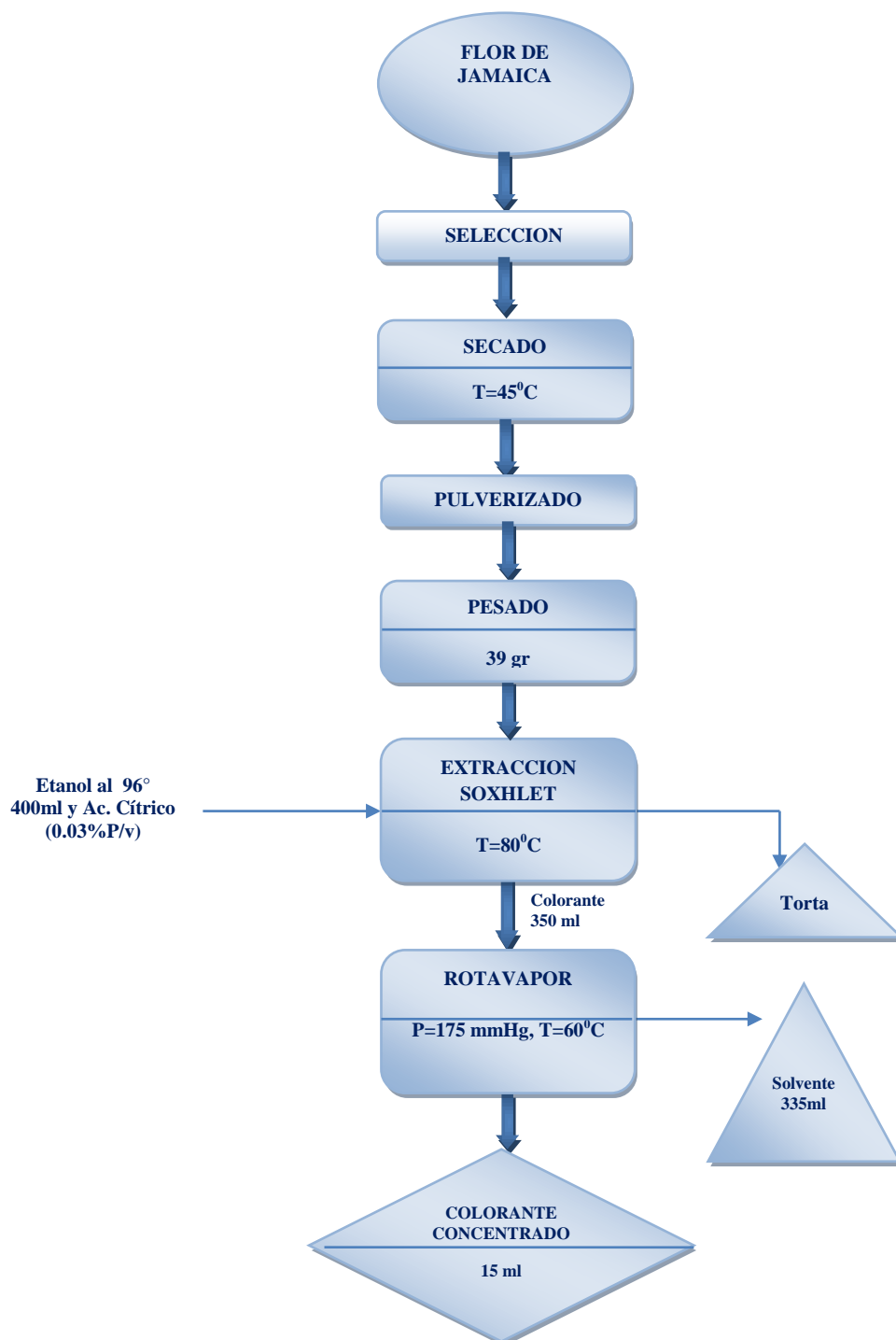
Posterior a la adición del colorante se procedió a medir el pH y el ° Dornic, del Yogurt y de la crema ácida respectivamente, además de observar los cambios en las propiedades organolépticas (sabor, color) del alimento en la cual fue aplicado el colorante.(Anexos Figuras N° 12-13)

### **7.3.5 Análisis estadístico**

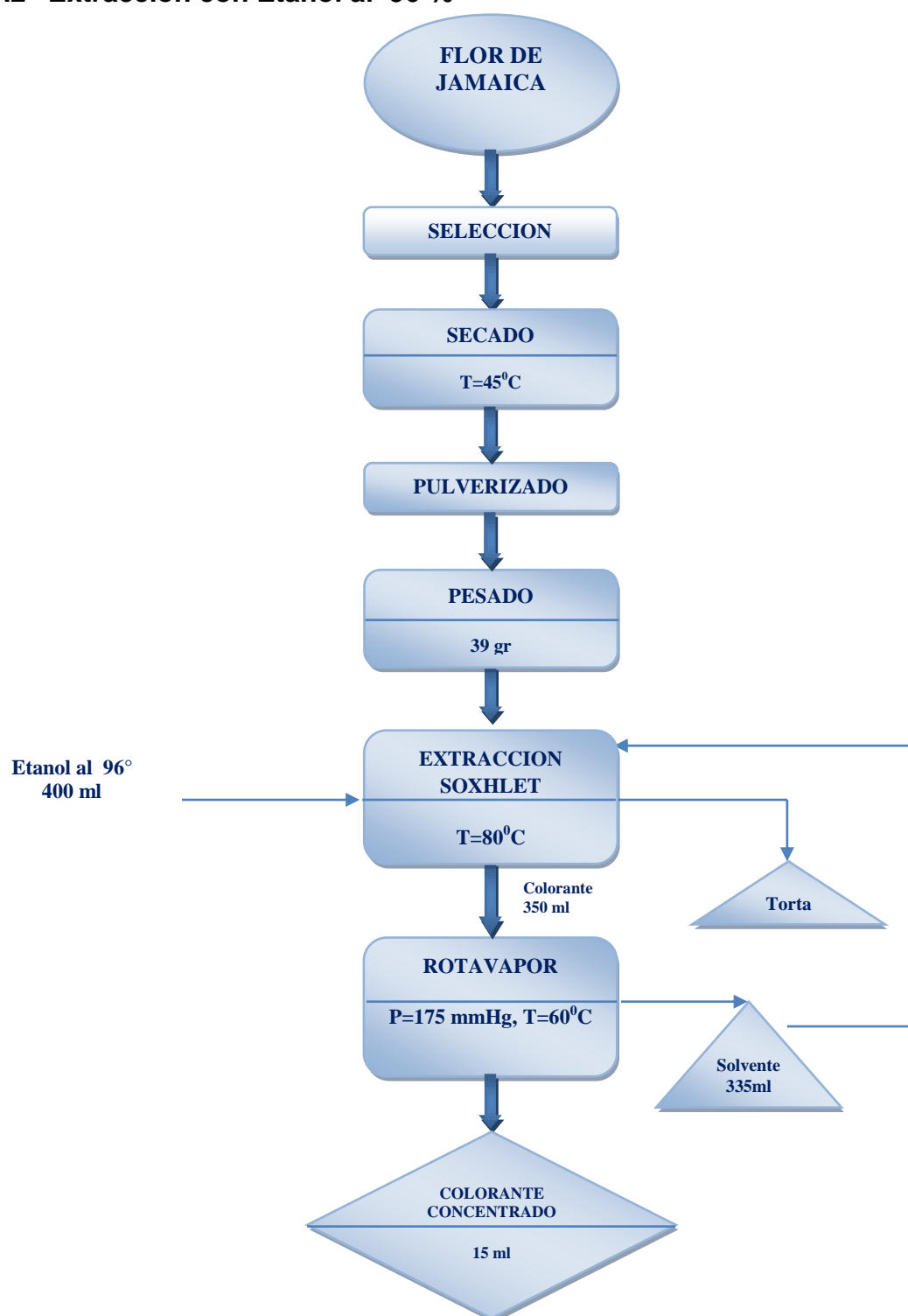
Se realizó Análisis de medias ( $\alpha=0.05$ ) mediante la prueba T de Student para determinar el efecto de los tratamientos sobre la variable en estudio, se utilizó **MINITAB®** Statistical Software versión 16.1.1. Además se realizaron pruebas de normalidad para ambos tratamientos con la solución acidificada y sin acidificar mediante el procedimiento Anderson- Darling.

## 7.4 Diagramas de Flujos Del Proceso

### 7.4.1 Extracción con Etanol al 96 % y 0.03% P/V de Ácido Cítrico.



#### 7.4.2 Extracción con Etanol al 96 %



## VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

### 8.1 Evaluación de las condiciones de Humedad.

En la Tabla N°8.1 se muestran los porcentajes de humedad de las 19 muestras utilizadas en el proceso de extracción, se recurrió al análisis estadístico de los datos con el fin de obtener información del comportamiento de la Humedad.

**Tabla N°8.1.** Porcentajes de Humedad de las muestras.

Muestra N°	Masa Inicial (gr.)	Masa Final (gr.)	% Humedad
1	45.36	39.58	14.60
2	45.32	39.14	15.78
3	45.54	39.70	14.71
4	45.53	39.68	14.74
5	45.50	39.67	14.69
6	45.52	39.99	13.82
7	45.56	40.59	12.24
8	45.56	40.39	12.80
9	45.51	39.90	14.06
10	45.43	39.83	14.05
11	45.60	39.83	14.48
12	45.60	40.09	13.74
13	45.57	39.84	14.38
14	45.49	40.80	11.49
15	46.00	40.82	12.68
16	46.00	41.00	12.19
17	46.00	41.03	12.11
18	45.00	40.12	12.16
19	45.04	40.23	11.95

El contenido promedio de humedad es de 13.51%. Los resultados obtenidos muestran un comportamiento normal, esto se observa en la Figura N°8.1, en la cual también se pueden localizar dos grupos de muestras, esto se debió a que se recurrió a dos equipos diferentes para el proceso de secado (mufla y horno secador), además que la materia prima que se utilizó contenía diferentes porcentajes de humedad inicial.

### 8.1.1 Análisis Estadístico.

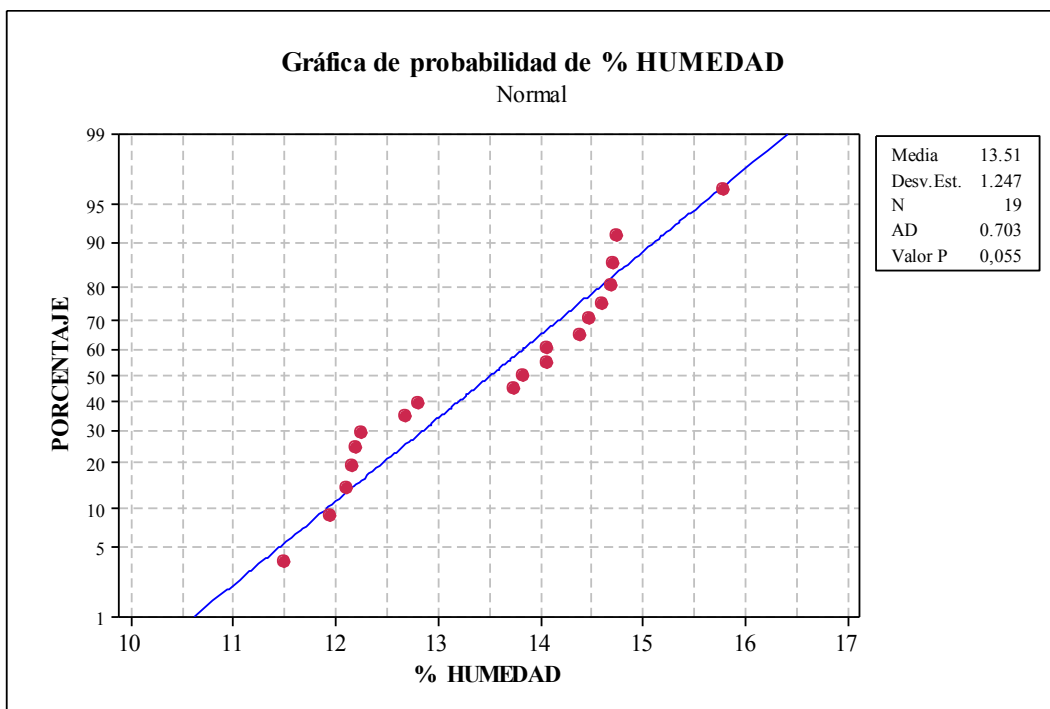
En el tratamiento estadístico para determinar la validez de los resultados del porcentaje de humedad se procesaron los datos, obteniendo la respuesta que a continuación se presenta.

**Tabla N°8.2.** Resultados estadísticos del procesamiento de los Datos de Porcentaje de Humedad.

<b>Prueba de normalidad de Anderson-Darling</b>	
A-cuadrado	0.70
Valor P	0.055
Media	13.514
Desv.Est.	1.247
Varianza	1.554
Asimetría	-0.07131
Kurtosis	-1.25525
N	19
Mínimo	11.495
1er cuartil	12.195
Mediana	13.828
3er cuartil	14.603
Máximo	15.789
Intervalo de confianza de 95% para la media	
12.913	14.115
Intervalo de confianza de 95% para la mediana	
12.238	14.502
<i>Intervalo de confianza de 95% para la desviación estándar</i>	
0.942	1.844

El valor de A-cuadrado para los datos es 0.70 y el valor P para el porcentaje de Humedad (0.055) es mayor que el nivel de confianza,  $\alpha = 0.05$ ; por lo que se concluyó que los datos siguen una distribución normal, observándose en la gráfica de probabilidad en la Figura. N°4.

Gráficamente estos datos se presentan en la Figura N°8.1 y N°8.2.

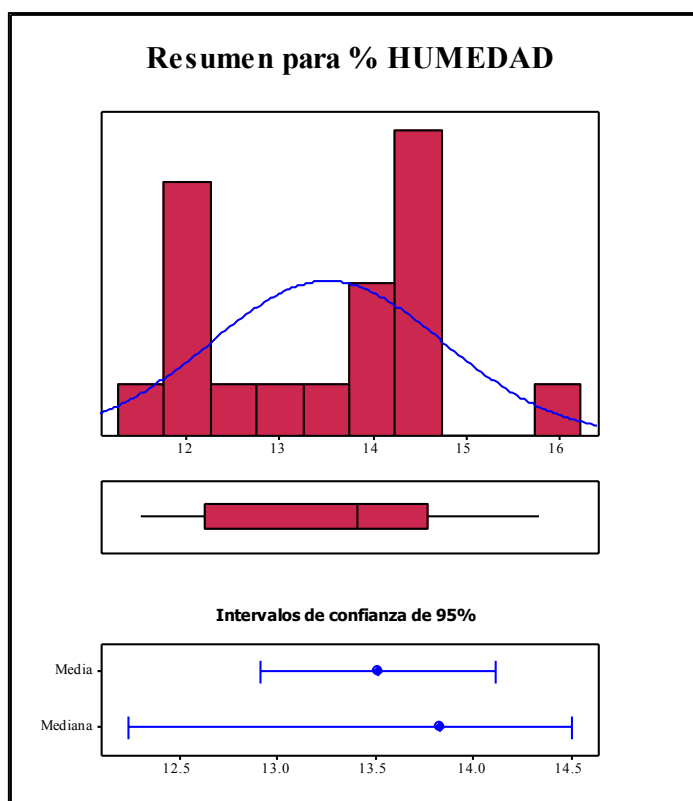


**Figura N°8.1.** Grafica para los Porcentajes de Humedad.

Se observó que la media muestral del porcentaje de Humedad está comprendida en 13.514. La desviación estándar es de 1.247, esto indica que, en promedio, los valores del conjunto de datos tienden a diferir de la media en  $\pm 1.247$ . La Varianza es 1.554.

El valor de asimetría es -0.07131, lo que indica que la distribución tiene un sesgo hacia la izquierda. Esto se debe a que la distribución se extiende más hacia la izquierda que hacia la derecha.

El valor de Kurtosis es -1.255525, lo que indica que la distribución es más plana que lo normal con picos abruptos. Esto se ilustra en el histograma (Figura N°5) que muestra que el pico de los datos no se eleva muy por encima de la curva normal (azul).



**Figura N°8.2.** Histograma para los datos de porcentajes de Humedad.

Para los datos el mínimo es 11.495 y el máximo es 15.789, el 25 % de las muestras son menores de 12.195, un 50% son menores que 13.928 y un 75 % de los datos son menores que 14.603.

Los intervalos de confianza indican que podemos estar seguros de que en el 95% de los datos:

- La media se encuentra entre 12.913 y 14.115.
- La desviación estándar se encuentra entre 0.942 y 1.844.
- La mediana se encuentra entre 12.238 y 14.502.

En consecuencia, los resultados obtenidos son válidos y confiables desde el punto de vista estadístico.

## 8.2 Condiciones Óptimas de Extracción con el equipo Soxhlet.

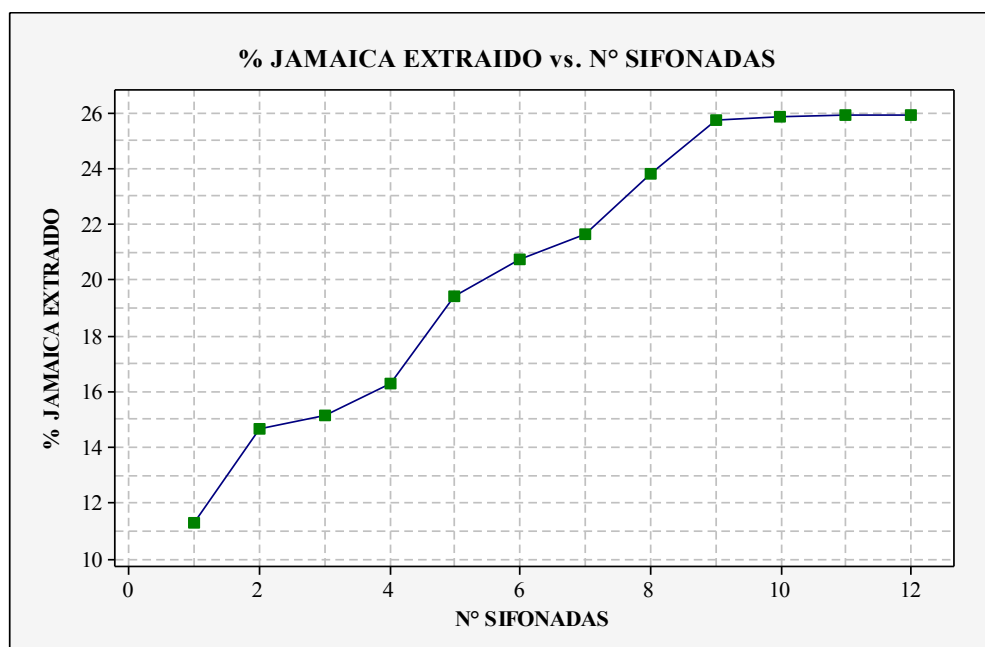
El número de sifonadas (cinética de la extracción) óptimo, fue determinado mediante experimentos preliminares, cuyo propósito primario era obtener una aproximación del comportamiento general del proceso de extracción. Mediante estas pruebas se obtuvieron los datos de la tabla N°8.3 la cual muestra el porcentaje de Jamaica extraído por cada sifonada. Este estudio igualmente fue de suma importancia para definir las condiciones de temperatura, tamaño de muestra y tiempo de extracción en el equipo Soxhlet.

**Tabla N°8.3.** Punto Óptimo de extracción de Flor de Jamaica.

<b>Peso Inicial (gr)</b>	<b>N° Sifonadas</b>	<b>Peso Final (gr)</b>	<b>Masa Extraída (gr)</b>	<b>Porcentaje de Jamaica Extraído (%)</b>
37.39	1	33.17	4.22	11.28
37.9	2	32.35	5.55	14.64
37.72	3	32.01	5.71	15.13
36.54	4	30.6	5.94	16.25
37.23	5	30	7.23	19.41
37.47	6	29.7	7.77	20.73
36.91	7	28.92	7.99	21.64
37.13	8	28.3	8.83	23.78
37.33	9	27.73	9.6	25.71
37.44	10	27.76	9.68	25.85
37.25	11	27.6	9.65	25.90
37.1	12	27.48	9.62	25.92

Los datos de Porcentaje de Jamaica extraído de la tabla N°7 se grafican y se obtuvo una curva general de extracción en función del número de sifonadas, en la cual se observó que las primeras sifonadas son las que más material se extrae y que luego de la 10ª sifonada la curva se hace casi asintótica (Figura N°8.3).



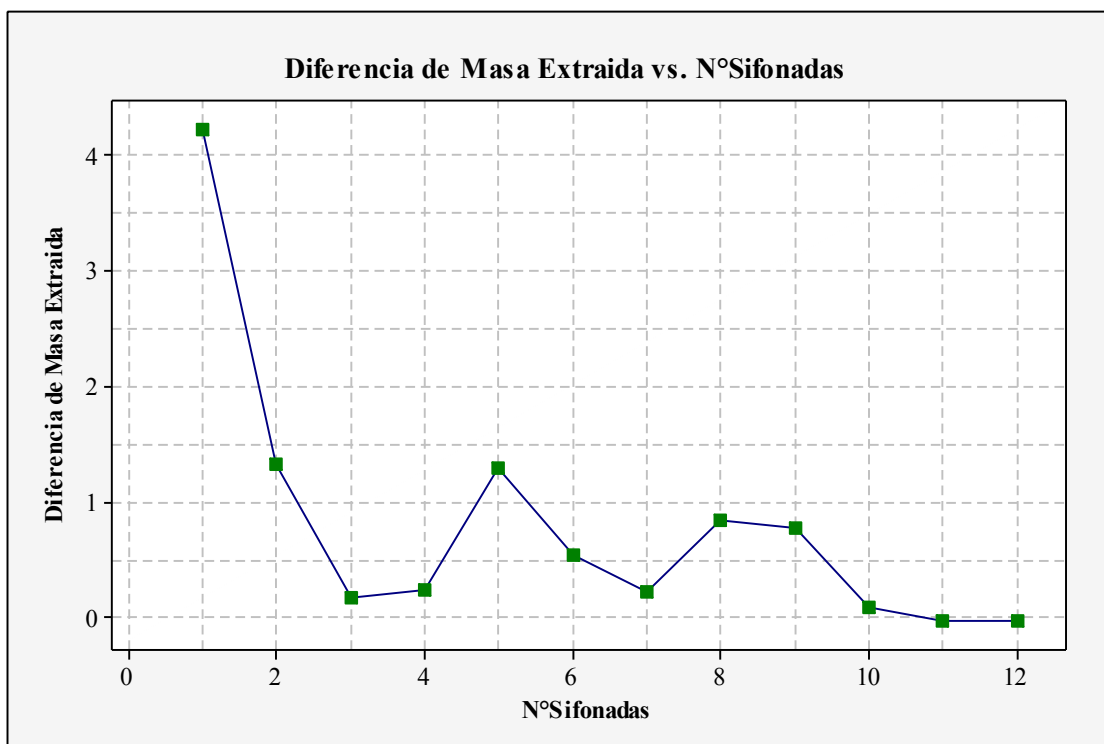


**Figura N°8.3.** Curva General de extracción (%Jamaica extraído vs N°Sifonadas).

De acuerdo al gráfico de extracción se evidencia que al comienzo del proceso se encuentra mucho material para extraer, luego a medida que avanza cada vez es más difícil de extraer la pequeña fracción restante, hasta que en las etapas finales no se logra extraer nada más. Este comportamiento se grafica con los datos de la tabla N°8 en la cual se determina la diferencia de masa de extraída con respecto a la sifonada anterior. En forma complementaria esto se logra apreciar gráficamente mediante la Figura N°8.4.

**Tabla N°8.4.** Diferencia de Masa Extraída por sifonadas.

N°Sifonadas	Masa Extraída (gr)	Diferencia de Masa Extraída
1	4.22	4.22
2	5.55	1.33
3	5.71	0.16
4	5.94	0.23
5	7.23	1.29
6	7.77	0.54
7	7.99	0.22
8	8.83	0.84
9	9.6	0.77
10	9.68	0.08
11	9.65	-0.03
12	9.62	-0.03



***Figura N°8.4. Curva de diferencias de masas extraídas por sifonadas.***

### 8.3 Resultados del proceso de Extracción.

Se procesaron estadísticamente los datos obtenidos en el proceso de extracción con equipo Soxhlet. 10 de los datos corresponden a los experimentos con la solución de Etanol Con Acido Cítrico y 10 restantes a los experimentos con Etanol, estos se muestran a continuación en la tabla N°8.5.

**Tabla N°8.5.** Datos para la masa extraída

Experimento N°	Masa extraída Con Ácido(gr)	Masa extraída Sin Ácido(gr)
1	12.60	11.82
2	13.18	13.07
3	12.31	9.01
4	11.95	11.94
5	10.90	11.97
6	13.64	12.96
7	7.19	10.23
8	10.62	10.99
9	8.74	9.13
10	9.99	9.50

#### 8.3.1 Estimación de parámetros.

Se estimaron los parámetros de las medias de los tratamientos con la solución acidificada y sin acidificar. Para el caso de las hipótesis es de interés probar si hay diferencias significativas entre las medias.

Teniendo en cuenta que;

$$H_0 \equiv \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 \equiv \mu_i \neq \mu_j \text{ (para al menos un par)}$$

Donde;

$\mu_1$  y  $\mu_2$  son las medias de los tratamientos.

#### 8.3.2 Selección de las pruebas estadísticas.

Se seleccionó la prueba t para el procesamiento de los datos debido a su precisión cuando la población es demasiado pequeña asumiendo que la distribución es normal. Para saber si se podía realizar dicha prueba se verificó la normalidad en la los datos del proceso de extracción para la solución acidifica y sin acidificar, mediante la prueba de Anderson-Darling.

#### **8.3.2.1.1 Prueba de Normalidad Anderson-Darling**

En la prueba de Anderson Darling se considera que si el valor  $P$  de la prueba estadística es mayor que 0.05, entonces los datos se encuentran dentro de una distribución normal. Por el cual mediante esta prueba podemos decir que:

$H_0$ , donde  $P > 0.05$ , entonces los datos siguen una distribución Normal

$H_1$ , donde  $P < 0.05$ , entonces los datos no siguen una distribución Normal.

Donde;  $P$  es el estadístico de referencia para la población en análisis.

$$H_0 \equiv \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 \equiv \mu_1 < \mu_2$$

Si ambas distribuciones son normales podemos aplicar la prueba  $t$ .

### 8.3.3 Pruebas de Normalidad para los procesos de extracción.

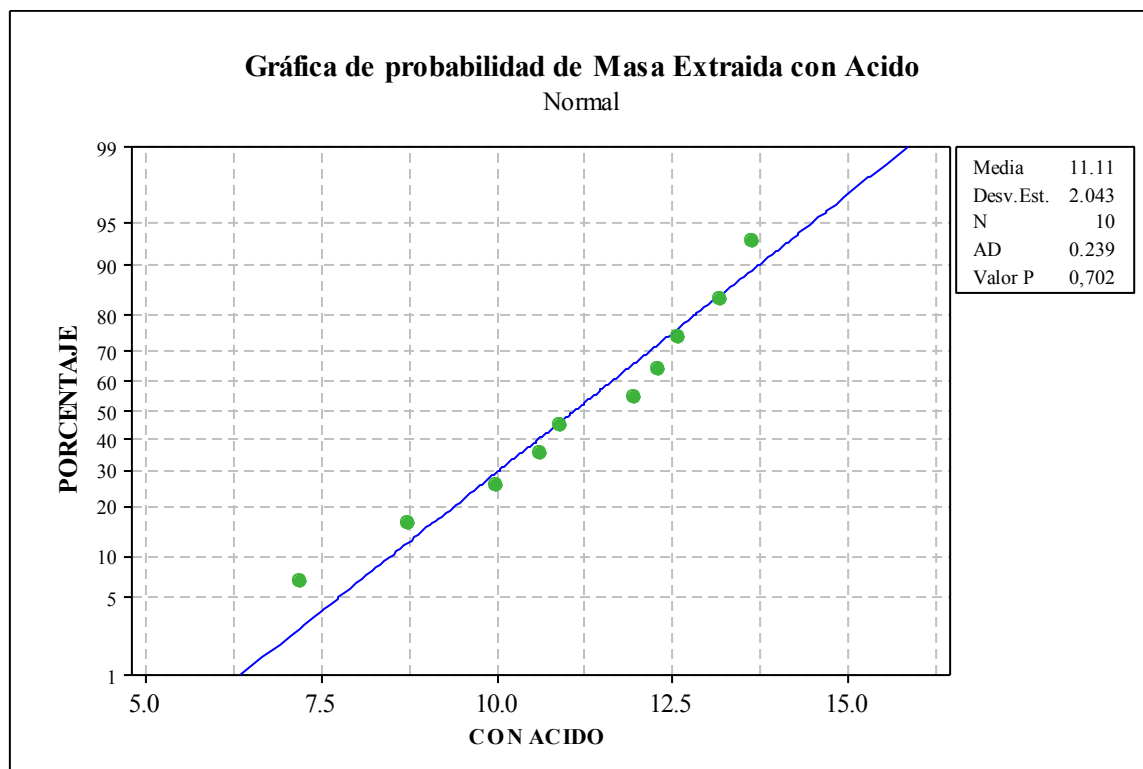
#### 8.3.3.1.1 Datos de solución acidificada.

En la tabla N°8.6 se muestran los resultados obtenidos del procesamiento estadístico de los datos de la masa extraída con la solución acidificada, mediante la prueba de Normalidad Anderson Darling.

**Tabla N°8.6.**Resultados estadísticos del procesamiento de los datos para la solución acidificada.

Prueba de normalidad de Anderson-Darling	
A-cuadrado	0.24
Valor P	0.702
Media	11.112
Desv.Est.	2.043
Varianza	4.175
Asimetría	-0.726394
Kurtosis	-0.125539
N	10
Mínimo	7.190
1er cuartil	9.677
Mediana	11.425
3er cuartil	12.745
Máximo	13.640
Intervalo de confianza de 95% para la media 9.650 12.574	
Intervalo de confianza de 95% para la mediana 9.562 12.799	
Intervalo de confianza de 95% para la desviación estándar 1.405 3.730	

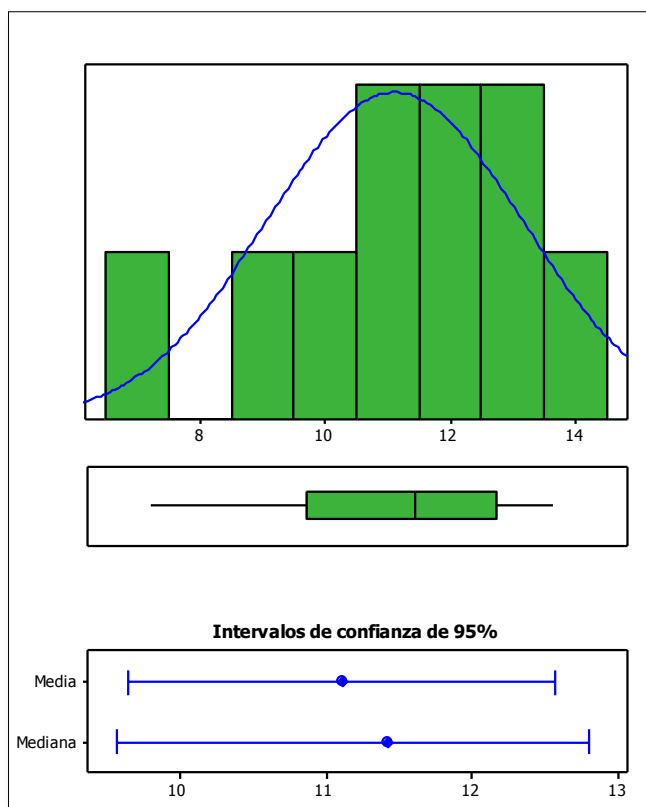
El valor de A-cuadrado para los datos de extracción con la solución acidifica es de 0.24, y el valor P asociado es 0.702 siendo mayor que el nivel de confianza,  $\alpha$  0.05; por lo que se concluye que los datos siguen una distribución normal, esto se comprueba con la gráfica de probabilidad en la figura N°8.5.



**Figura N°8.5.** Gráfica de probabilidad de los datos procesados para la solución acidificada.

Se observó que la media muestral está comprendida en 11.112. La desviación estándar es de 2.043, esto indica que, en promedio, los valores del conjunto de datos tienden a diferir de la media en  $\pm 2.043$ . La Varianza para los datos es de 4.176.

El valor de asimetría para los datos es de -0.726394, lo que indica que la distribución tiene un sesgo hacia la izquierda. El valor de kurtosis es -0.125539, indicando que la distribución es más plana que lo normal. Esto se ilustra en el histograma (Figura N° 8.6.) que muestra que el pico de los datos no se eleva muy por encima de la curva de normalidad (azul).



**Figura N°8.6.** Histograma de los datos procesados para la solución Acidificada.

Para los datos el mínimo es de 7.190 y el máximo es 13.640, el 25 % de las muestras son menores de 9.607, un 50% son menores que 11.425 y un 75 % de los datos son menores que 12.745.

Los intervalos de confianza indican que podemos estar seguros en un 95 % de confianza que:

- La media se encuentra entre 9.650 y 12.574.
- La desviación estándar se encuentra entre 1.405 y 3.730.
- La mediana se encuentra entre 9.562 y 12.799.

En consecuencia las estimaciones realizadas son válidas estadísticamente y confiables para asumir que tienen un comportamiento normal.

### 8.3.3.1.2 Datos de Solución sin acidificar.

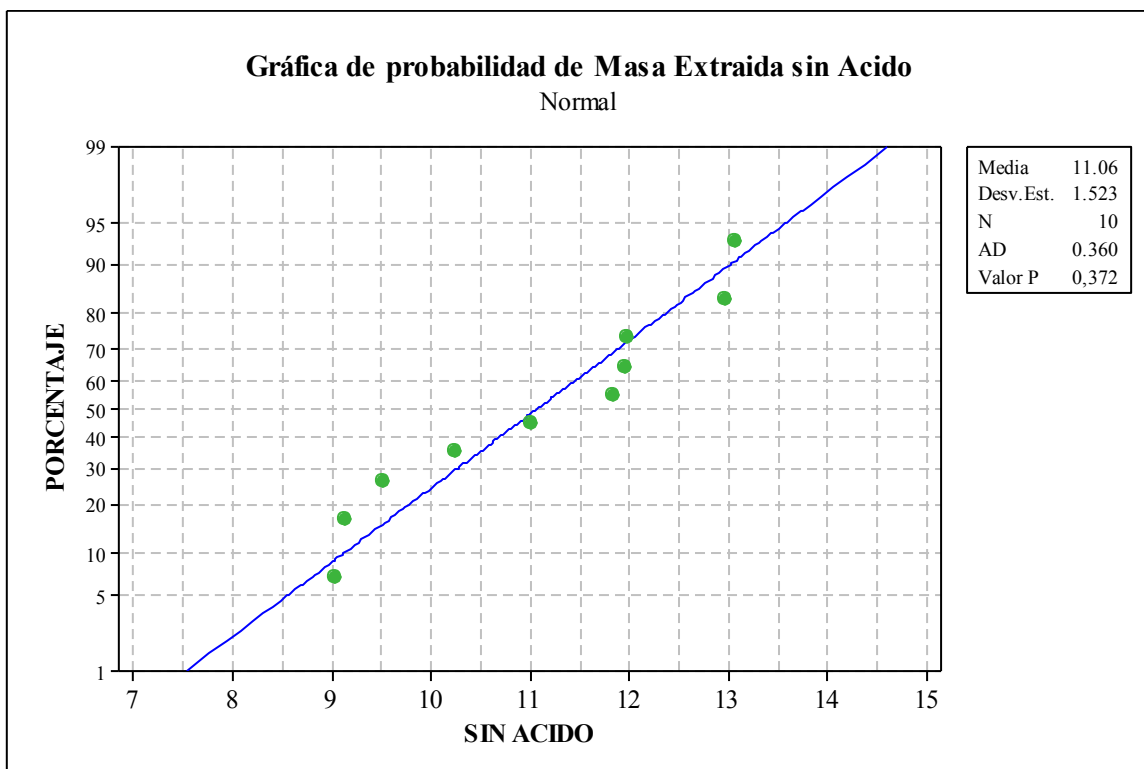
En la tabla N°8.7 se muestran los resultados obtenidos del procesamiento estadístico de los datos de la masa extraída con la solución sin acidificar, mediante la prueba de Normalidad Anderson Darling.

**Tabla N°8.7.** Resultados estadísticos del procesamiento de los datos para la solución sin acidificar.

Prueba de normalidad de Anderson-Darling	
A-cuadrado	0.36
Valor P	0.372
Media	11.062
Desv.Est.	1.523
Varianza	2.321
Asimetría	-0.13533
Kurtosis	-1.54539
N	10
Mínimo	9.010
1er cuartil	9.407
Mediana	11.405
3er cuartil	12.217
Máximo	13.070
Intervalo de confianza de 95% para la media 9.972 12.152	
Intervalo de confianza de 95% para la mediana 9.373 12.309	
Intervalo de confianza de 95% para la desviación estándar 1.048 2.781	

El valor de A-cuadrado para los datos de extracción con la solución sin acidificar es de 0.36, y el valor p asociado es 0.372 siendo mayor que el nivel de confianza,  $\alpha$  0.05; por lo que se concluye que los datos siguen una distribución normal, esto se observa en la gráfica de probabilidad de la extracción para la solución sin acidificar en la Fig. N°8.7.

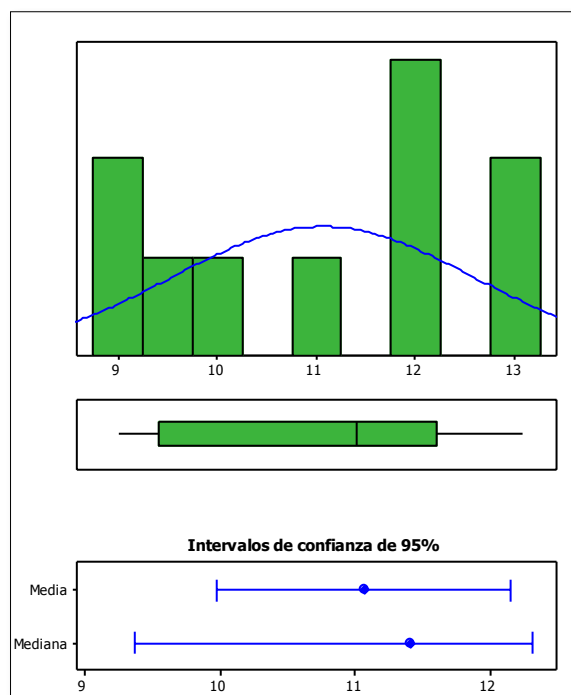




**Figura N°8.7.** Gráfica de probabilidad de los datos procesados para la solución sin acidificar.

La media muestral es 11.062. La desviación estándar es de 1.523, esto indica que, en promedio, los valores del conjunto de datos tienden a diferir de la media en  $\pm 1.523$ . La Varianza para los datos es de 2.321.

El valor de asimetría para los datos es de -0.1353, lo que indica que la distribución tiene un sesgo hacia la izquierda. El valor de kurtosis es -1.54539, indicando que la distribución tiene picos más planos que lo normal. Esto se ilustra en el histograma (Figura N°8.8) que muestra que los picos de los datos no se elevan muy por encima de la curva de normalidad (azul).



**Figura N°8.8.** Histograma de los datos procesados para la solución sin acidificar.

Para los datos el mínimo es de 9.010 y el máximo es 13.070. El 25 % de las muestras son menores de 9.407, un 50% son menores que 11.405 y un 75 % de los datos son menores que 12.217.

Los intervalos de confianza indican que se puede estar seguro con un 95 % de confianza de que:

- La media se encuentra entre 9.972 y 12.152.
- La desviación estándar se encuentra entre 1.048 y 2.781
- La mediana se encuentra entre 9.373 y 12.309.

### 8.3.4 Prueba t de Student.

Los datos obtenidos en el proceso de extracción con la solución acidificada y sin acidificar, están distribuidos normalmente, lo que implica que mediante la prueba t de Student, se puede determinar que no hay diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

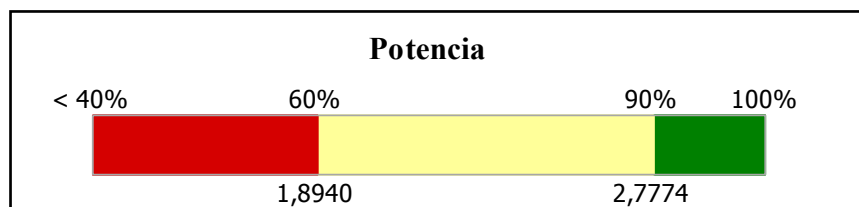
#### 8.3.4.1 Cálculo de Potencia

La potencia de una prueba es su capacidad para detectar un efecto. Siempre es posible que, debido a un error de muestreo, una prueba conduzca a la conclusión equivocada. La evaluación de la potencia permite determinar la probabilidad de que la prueba identifique correctamente un efecto si éste existe.

En la tabla N°8.8 se muestra el análisis de potencia de los datos de la extracción con la solución acidifica y sin acidificar, en cual se observó que para un nivel de confianza,  $\alpha=0.05$  y tamaños de muestra  $n=10$ , Si hubiera una diferencia de 1.9840 entre las medias se tendría una probabilidad de detectar la diferencia en un 60%, y para una diferencia del 2.7774 habría la probabilidad de un 90%.

**Tabla N°8.8.** Análisis de potencia

Diferencia	Potencia
1,8940	60,0
2,1267	70,0
2,3992	80,0
2,7774	90,0



**Figura N°8.9.** Análisis de potencia para la solución acidificada y sin acidificar.

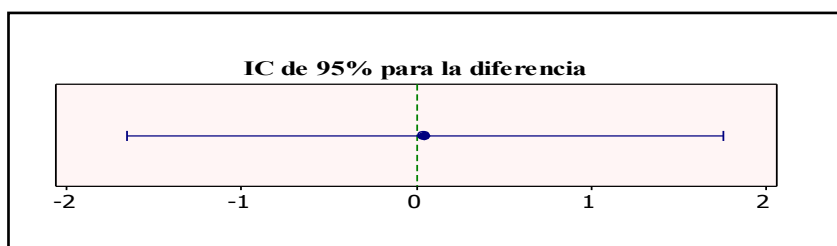
#### 8.3.4.1.2 Análisis comparativo entre medias

Según los datos de la tabla N°8.9 podemos cuantificar que la media con solución acidificada no es significativamente diferente de la media sin ácido ( $p > 0.05$ ).

**Tabla N°8.9.** Prueba T de Student para la media con la solución acidificada y sin acidificar.

ESTADÍSTICAS	CON ÁCIDO	SIN ÁCIDO
Tamaño de la muestra	10	10
Media	11,112	11,062
IC de 95%	( 9,650; 12,57)	(9,9723; 12,152)
Desviación estándar	2,0432	1,5233
Diferencias entre medias	0.05	
Diferencias entre intervalos de confianza 95%	(-1,6585 y 1,7585)	

El intervalo de confianza cuantifica la incertidumbre asociada a la distribución a partir de los datos de las muestras, en el cual se puede tener una seguridad del 95% de que la diferencia verdadera se encuentra entre los valores de -1,6585 y 1,7585. Se observa mediante la Figura. N°8.10 que los rangos del intervalo de confianza incluye cero lo que indica que las diferencias no son significativas entre un tratamiento y otro.

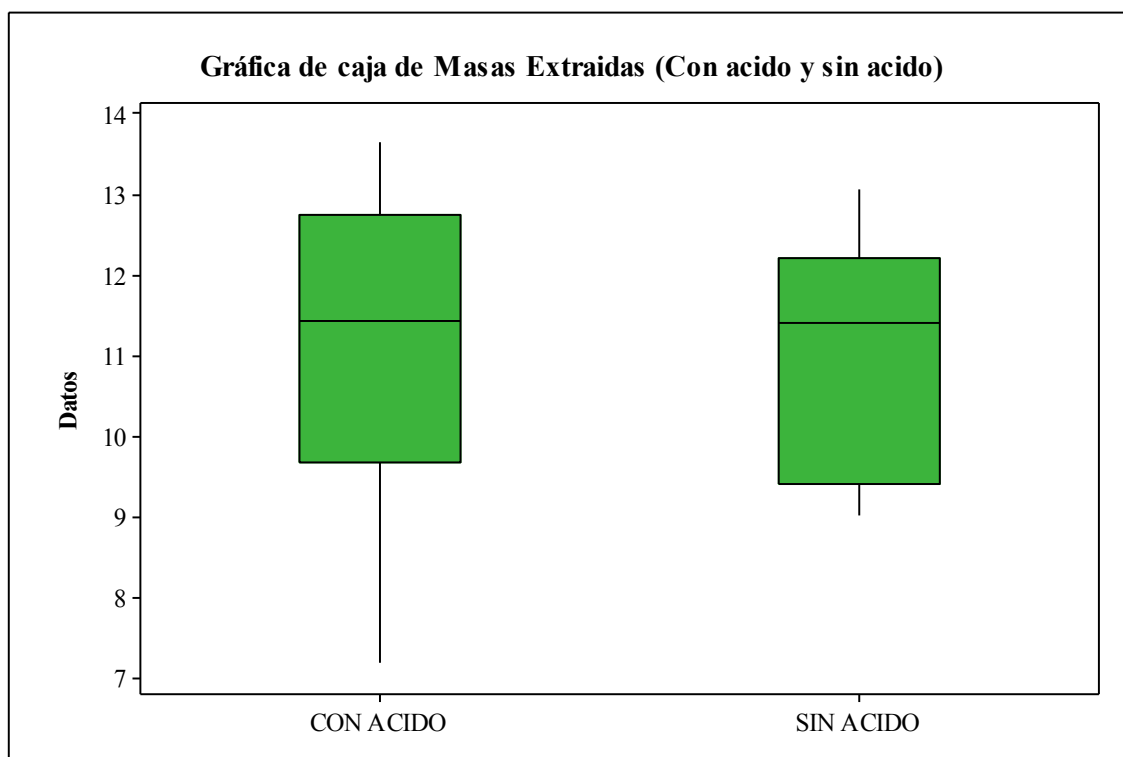


**Figura N°8.10.** Intervalo de Confianza al 95%.

### 8.3.4.1.3 Gráfica de Cajas

Las gráficas de caja de los datos ilustran que:

Las medianas para cada muestra son muy similares a las medias. La extracción promedio fue mayor con ácido que sin ácido. (Esto se confirmó con los datos de desviación estándar, mediante los resultados de la prueba t). La dispersión de los datos es prácticamente la misma para ambos tratamientos, con la excepción de que el tratamiento sin ácido tiene una cola inferior más larga que la cola del tratamiento con ácido.



**Figura N°8.11.** Diagrama de caja para las masas extraídas.

#### **8.4 Evaluación del poder tintóreo y estabilidad en el tiempo**

Para las pruebas discriminativas del colorante concentrado se recurrió a la Industrias Lácteas ESKIMO. La prueba consistió en evaluar el poder tintóreo y la estabilidad de coloración en la Crema ácida con nuestro colorante natural de Flor de Jamaica.

Para las pruebas del colorante concentrado en el Yogurt Natural se midieron los mismos parámetros utilizados en la prueba de Crema ácida. Los datos obtenidos se muestran en la tabla N°8.10.

**Tabla N°8.10.** Evaluación del poder tintóreo y estabilidad en el tiempo.

<b>Producto</b>	<b>Inicio</b>	<b>Final</b>
200 ml de Crema ácida + 2 ml de Colorante concentrado	Acidez: 83°D. Color: Blanco.	Acidez: 160 °D. Color: Amarillo -Anaranjado.
200 gr de Yogurt Natural + 2 ml de Colorante concentrado	pH: 4.5 Color: Blanco	pH: 2 color: Amarillo-Anaranjado

Se observó que en la crema ácida se originó un aumento en su acidez de 77°D, teniendo como resultado una crema de color amarillo anaranjado y cambiando el sabor considerablemente.

Según las referencias de la Industria Lácteas ESKIMO las cantidades máximas permitidas tanto de Colorante Artificial como Natural en sus productos, es de una concentración al 0.05%, mientras que con la adición del colorante obtenido mediante la Flor de Jamaica, para lograr tinción se tuvo que llegar a una concentración del 1%, el cual afectó el sabor de manera significativa.

Para las pruebas en Yogurt se obtuvieron resultados similares que en la crema ácida en cuanto a sabor, color y varió su acidez de pH 4.5 a pH 2. Los efectos negativos fueron prácticamente los mismos que en la prueba con crema ácida. El sabor se alteró tornándose algo amargo y mucho más ácido, y el olor varió significativamente, dando como resultado un producto incomedible y arruinado.

## **IX. CONCLUSIONES**

Como característica fisicoquímica se evaluó el porcentaje de humedad de la Flor de Jamaica utilizada en el proceso de extracción, los porcentajes de humedad óptimos para el proceso se encuentran en un rango de 11% y 15%, siendo el promedio de las muestras 13.51%. Resultados mayores o menores a estos inciden en el rendimiento de la extracción. Este valor nos indica que la Flor de Jamaica es apropiada para el desarrollo de los experimentos de extracción de colorante.

Los experimentos desarrollados en la extracción de la Flor de Jamaica, permitieron obtener suficientes datos para determinar la influencia del pH en la solución extractora. Mediante las pruebas de poder tintóreo y su estabilidad en el tiempo, se logró determinar que el colorante con solución acidificada tiene mayor estabilidad en los alimentos.

Experimentalmente fueron establecidos los parámetros necesarios para tener un mejor control sobre las variables que pueden afectar en el proceso. Estas variables son: materia prima, tiempo de secado y temperatura. Una vez obtenido el colorante los parámetros a mantener son: la temperatura de refrigeración y el aislamiento a la luz, mediante su envase en frascos ámbar.

El poder tintóreo del extracto concentrado obtenido, para su utilización en la industria alimenticia es limitado, dado que afecta las propiedades organolépticas de los alimentos. Esta limitación se debe a que la cantidad para lograr tinción es mucho mayor que la que se utiliza actualmente en la industria.

No hay diferencias significativas entre los tratamientos con solución acidificada y sin acidificar, puesto que el pH no afecta el rendimiento de la extracción, por lo cual se acepta la hipótesis nula planteada en la presente investigación y se rechaza la hipótesis alternativa.

## **X. RECOMENDACIONES**

A partir de la experiencia adquirida en el desarrollo de la extracción de colorante natural a partir de la Flor de Jamaica, se sugiere evaluar el método de liofilización para el secado de la materia prima y estudiar su efecto en el producto final.

Se recomienda controlar la temperatura en las etapas de los experimentos para evitar la degradación del colorante durante la extracción, así mismo, que en el producto final (extracto concentrado) se mantenga a temperaturas de refrigeración para prolongar su vida útil.

Se sugiere un proceso de purificación del colorante posterior a su obtención, previo a la determinación del pH óptimo, con el objetivo de establecer condiciones en las que se obtiene un producto más estable para su aplicación en alimentos.

Otra aplicación importante y que se debe estudiar, son los procesos en los que obtenga el colorante en polvo; para ello se sugiere la eliminación del solvente mediante un secador por Aspersión o por Liofilización.

La extracción del colorante se hizo por medio de lixiviación con Etanol, sin embargo existen numerosos solventes que deben ser estudiados pero que no fueron incluidos en el presente trabajo dado que los mismos no formaban parte del alcance y evaluación; por lo que se sugiere evaluar la extracción por medio de otro solvente dependiendo de las características físico - químicas de la materia prima y la utilización que se le dará posteriormente al colorante.



## **XI. BIBLIOGRAFÍA**

- (s.f.). Recuperado el 28 de Mayo de 2012, de <http://html.rincondelvago.com/colorantes.html>
- (s.f.). Obtenido de <http://html.rincondelvago.com/colorantes.html>
- (s.f.). Recuperado el 28 de Mayo de 2012, de El Rincon del Vago: <http://html.rincondelvago.com/colorantes.html>
- *CHR HANSEN* . (28 de Abril de 2008). Recuperado el 25 de Junio de 2012, de CHR HANSEN : <http://www.chr-hansen.es/noticias/singlenoticias/futuro-brillante-para-los-colorantes-naturales.html>
- *Bristhar Laboratories*. (2010). Recuperado el 28 de Marzo de 2011, de <http://www.bristhar.com.ve/acidocitrico.html>
- *IFOOD*. (15 de Septiembre de 2010). Recuperado el 4 de Julio de 2012, de IFOOD: <http://www.ifood.tv/blog/food-coloring-history-the-color-in-your-food>
- *Acido Cítrico*. (s.f.). Recuperado el 28 de Marzo de 2011, de <http://www.bristhar.com.ve/acidocitrico.html>
- Augstburger, F., & Berger, J. (2000). *Hibisco*. Obtenido de Hibisco: [http://www.naturland.de/fileadmin/MDB/documents/Publication/Espanol/hibisco\\_2005.pdf](http://www.naturland.de/fileadmin/MDB/documents/Publication/Espanol/hibisco_2005.pdf)
- Brucelas, F. (s.f.). *Revista Trece Grados*. Recuperado el 28 de Mayo de 2012, de [http://www.revistatrecegrados.com.ar/ver\\_not\\_2.php?id=33](http://www.revistatrecegrados.com.ar/ver_not_2.php?id=33)
- Brucelas, F., & Vicario, F. (4 de Julio de 2012). *Trece Grados*. Recuperado el 28 de Mayo de 2012, de Trece Grados: [http://www.revistatrecegrados.com.ar/ver\\_not\\_2.php?id=33](http://www.revistatrecegrados.com.ar/ver_not_2.php?id=33)
- Cabal, E. (s.f.). *Aditivos prescindibles. Colorantes y edulcorantes*. Recuperado el 07 de Marzo de 2011, de [http://www.holistika.net/nutricion/articulos/aditivos\\_prescindibles\\_colorantes\\_y\\_edulcorantes.asp](http://www.holistika.net/nutricion/articulos/aditivos_prescindibles_colorantes_y_edulcorantes.asp)
- *Cadena de la Jamaica. pdf*. (s.f.). Recuperado el 03 de Febrero de 2011, de <http://www.cofupro.org.mx/Publicacion/Archivos/penit96.pdf>
- Calvo, M. (s.f.). *Bioquímica de los alimentos/Aditivos elementales*. Recuperado el 07 de Marzo de 2011, de Colorante artificiales: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/aditivos/colorartif.html>
- Chais, G. (s.f.). *Aditivos Alimentarios*. Recuperado el 31 de Enero de 2011, de <http://www.monografias.com/trabajos41/aditivos-alimentarios/aditivos-alimentarios.shtml>
- *Clasificación de colorantes naturales*. (s.f.). Recuperado el 07 de Marzo de 2011, de [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/meiq/perez\\_l\\_oa/capitulo4.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/meiq/perez_l_oa/capitulo4.pdf)
- *Colorantes*. (s.f.). Recuperado el 15 de 02 de 2011, de <http://www.santana.com.ar/prodingredient.asp>
- *Colorantes*. (s.f.). Recuperado el 15 de Febrero de 2011, de <http://html.rincondelvago.com/colorantes.html>

- *Colorantes Alimentarios*. (s.f.). Recuperado el 12 de Febrero de 2011, de [http://es.wikipedia.org/wiki/Colorante\\_alimentario](http://es.wikipedia.org/wiki/Colorante_alimentario)
- *Colorantes Alimentarios. Explicacion*. (s.f.). Recuperado el 07 de Marzo de 2011, de <http://spanish.alibaba.com/products/food-dye.html>
- *Colorantes Alimenticios*. (s.f.). Recuperado el 03 de Marzo de 2011, de <http://www.proquimac.com/Colorantes/Colorantes-Alimentarios.html>
- *Colorantes para uso alimentario*. (s.f.). Recuperado el 15 de Febrero de 2011, de <http://www.paginasamarillas.com.ar/portalPA/search/actividad/colorantes-para-uso-alimenticio-3606>
- *Colorantes y aditivos alimentarios*. (s.f.). Recuperado el 15 de Febrero de 2011, de <http://www.hotfrog.es/Productos/Colorantes-Y-Aditivos-Alimentarios>
- *Colorantes y Conservantes*. (s.f.). Recuperado el 15 de Febrero de 2011, de <http://html.rincondelvago.com/colorantes-y-conservantes.html>
- Eduardo, N. C. (s.f.). Recuperado el 11 de Enero de 2011, de Extracción con equipo Soxhlet. pdf:  
<http://www.cenunez.com.ar/Documentos%20lab.%20qu%C3%ADm/Extracci%C3%B3n%20con%20equipo%20Soxhlet.pdf>
- FENNEMA, O. (2010). FENNEMA Química de los Alimentos. En S. P. DAMODARAN, *Química de los Alimentos* (pág. 630). Acribia.
- Fennema, O. R. (s.f.). *Química de los Alimentos*.
- Fernando., B. (s.f.). *Revista Trece Grados*. Recuperado el 28 de Mayo de 2012, de [www.revistatrecegrados.com.ar/ver\\_notas.php?id=33](http://www.revistatrecegrados.com.ar/ver_notas.php?id=33)
- *Flor de Jamaica. pdf*. (s.f.). Recuperado el 11 de Enero de 2011, de [http://www.cuentadelmilenio.org.ni/Documentos/PNR/2007/Flor\\_de\\_Jamaica.pdf](http://www.cuentadelmilenio.org.ni/Documentos/PNR/2007/Flor_de_Jamaica.pdf)
- Fransisco, U. T. (s.f.). *Manual técnico de la Flor de Jamaica. pdf*. Recuperado el 30 de Enero de 2011, de [http://www.occidenteagricola.com/info/doc\\_evaluaciones/pdf/manuales%20tecnicos%20horticolas/Manual%20tecnico%20Flor%20de%20Jamaica.pdf](http://www.occidenteagricola.com/info/doc_evaluaciones/pdf/manuales%20tecnicos%20horticolas/Manual%20tecnico%20Flor%20de%20Jamaica.pdf)
- *Fundamentos de química. Practica N° 4*. (s.f.). Recuperado el 03 de Marzo de 2011, de Espectrofotometría:  
<http://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/quimbiotec/FQpractica4.pdf>
- Garzón, G. A. (31 de Mayo de 2008). Recuperado el 5 de Diciembre de 2011, de <http://www.virtual.unal.edu.co/revistas/actabiol/PDF%27s/v13n3/v13n3a2.pdf>
- Guzman, G. (23 de octubre de 2008). <http://cedoc.magfor.gob.ni/documentos/magfor/e21-0150.pdf>. Recuperado el 28 de Marzo de 2011, de <http://cedoc.magfor.gob.ni/documentos/magfor/e21-0150.pdf>:  
<http://cedoc.magfor.gob.ni/documentos/magfor/e21-0150.pdf>

- Juran, J. (2005). Manual de Control de Calidad. En J. Juran, *Manual de Control de Calidad* (págs. 1011-1012). Barcelona: Reverte.
- *Liofilización*. (s.f.). Recuperado el 06 de Febrero de 2011, de <http://www.novaingredients.com/store/pages.php?pageid=13>
- *Los reguladores de la acidez y el pH de los alimentos*. (s.f.). Recuperado el 28 de Marzo de 2011, de <http://www.masmusculo.com.es/health/los-reguladores-de-acidez-y-el-ph-de-los-alimentos/>
- Medrano, E. (2 de Marzo de 2010). Recuperado el 8 de Noviembre de 2011, de <http://www.makymat.com/contenido/archivospdf/AcidoCitrico.pdf>
- Nuñez, C. E. (2008). Recuperado el 11 de Enero de 2011, de Extracción con equipo Soxhlet. pdf: <http://www.cenunez.com.ar/Documentos%20lab.%20qu%C3%ADm/Extracci%C3%B3n%20con%20equipo%20Soxhlet.pdf>
- Pelayo, M. (30 de Septiembre de 2007). *WebIslam*. Recuperado el 10 de Noviembre de 2011, de WebIslam: [http://www.webislam.com/articulos/32250-colorantes\\_alimentarios\\_e\\_hiperactivad\\_infantil.html](http://www.webislam.com/articulos/32250-colorantes_alimentarios_e_hiperactivad_infantil.html)
- *Produccion de sustancias colorantes, aromaticas y medicinales naturales*. (s.f.). Recuperado el 14 de Febrero de 2011, de <http://www.herbotecnia.com.ar/c-biblio015-19.html>
- Revista temas de vida, I. v. (s.f.). *Colorantes atractivos pero nocivos*. Recuperado el 03 de Marzo de 2011, de <http://www.familia.cl/salud/colorantes/colorantes.htm>
- Rivera, J. L. (2010). Extracción experimental de colorantes naturales a partir de la zanahoria, hoja de espinaca y semilla de aguacate. *Tesina*. Managua, Nicaragua: UNI.
- Treybal, R. E. (1988). *Operaciones de Transferencia de Masa*. Mexico: McGraw-Hill.
- Treybal, R. E. (s.f.). *Operaciones de transferencia de masa*. 2/e. Mc Graw Hill.
- Urbina Torres, F. (s.f.). *Manual técnico de la Flor de Jamaica*. pdf. Recuperado el 30 de Enero de 2011, de [http://www.occidenteagricola.com/info/doc\\_evaluaciones/pdf/manuales%20tecnicos%20horticolas/Manual%20tecnico%20Flor%20de%20Jamaica.pdf](http://www.occidenteagricola.com/info/doc_evaluaciones/pdf/manuales%20tecnicos%20horticolas/Manual%20tecnico%20Flor%20de%20Jamaica.pdf)
- *Velocidad de Tinción*. (s.f.). Recuperado el 04 de Abril de 2011, de <http://www.edym.com/CD-tex/2p/tintura/cap13-1.htm>

## **XII. ANEXOS**

### **ANEXOS 1. IMÁGENES**



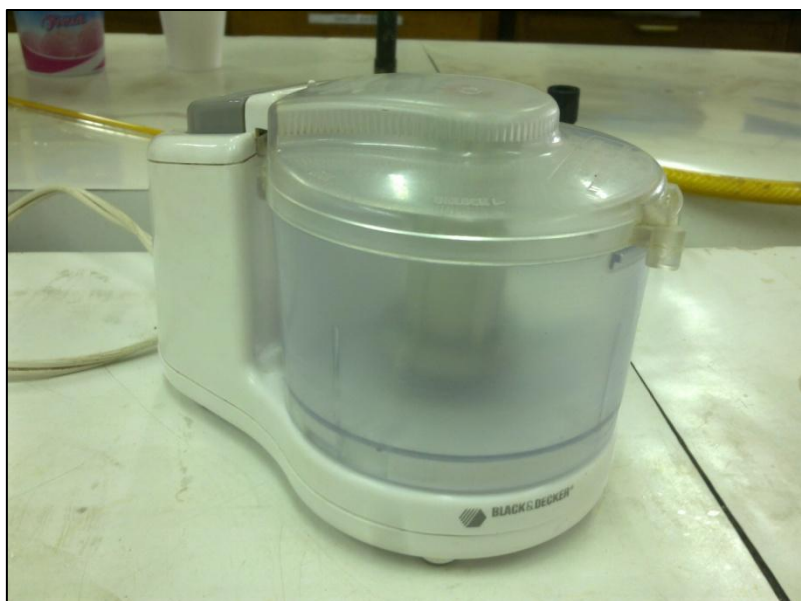
**Figura N° 1.** Materia prima, Flor de Jamaica.



**Figura N°2.** Balanza semi analítica Scout-Pro OHAUS de 200 gr.



**Figura N°3.** Barnstead Thermolyne Furnace 6000. Mufla modelo F6010.



**Figura N°4.** Mini-procesador Black & Decker. Modelo HC 3000 3-700X





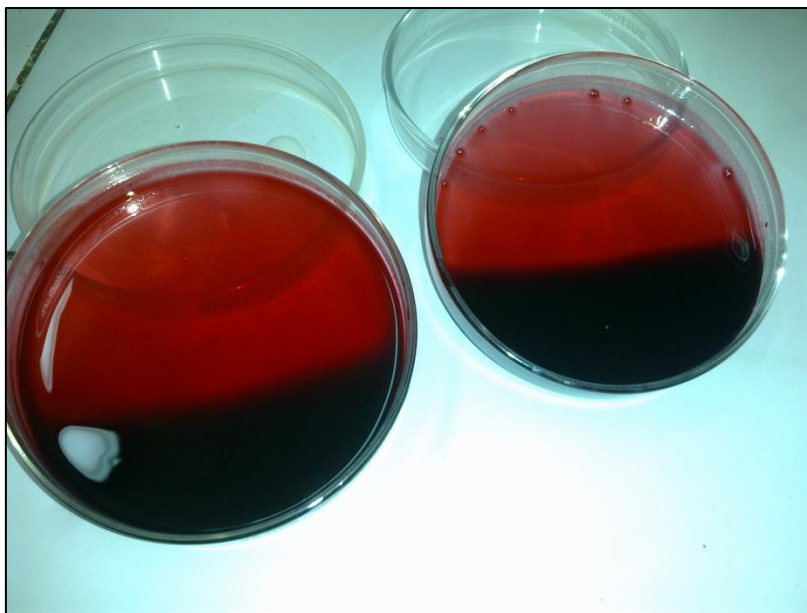
**Figura N°5.** Extractor Soxhlet, batería para tres equipos, conectados en serie.



**Figura N°6.** Balón fondo de pera con 250ml de colorante listo para concentrarse en el Rotavapor.



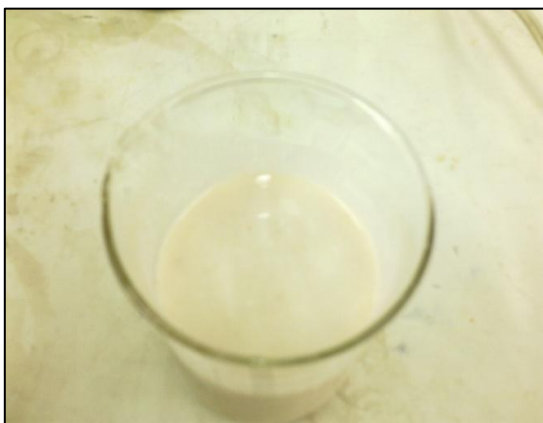
**Figura N°7.** Rotavapor B.Ü.C.HI. Modelo R124529 B480.



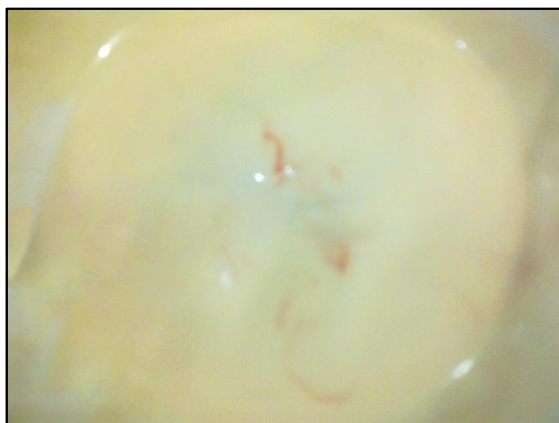
**Figura N°8.** Muestras de colorante concentrado, con ácido cítrico y sin ácido cítrico.



**Figura N° 9**



**Figura N° 10**



**Figura N° 11**

**Figura N°9, Figura N° 10, Figura N°11. Pruebas en Yogurt Natural.**





**Figura N°12**



**Figura N°13**

**Figura N°12 y Figura N°13. Pruebas en Crema Ácida.**